

## 明細書

## hERG チャネル発現細胞

## 5 技術分野

本発明は安全性の面において薬剤研究開発時に大きな問題となっている心電図 QT 間隔延長による心臓への副作用のリスクを回避するための評価細胞とその細胞樹立法およびそれらによる薬物の評価に関するものである。

## 10 背景技術

安全性薬理試験は、新規医薬品のヒトに対する安全性を薬理学的観点から検討する非臨床試験である。被験物質のヒトに対する安全性の検討と副作用予測などを目的とした安全性薬理試験ガイドラインが日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) において制定されており、そのガイドラインによれば、安全性薬理試験の一環として、被験物質の催不整脈作用、特に心電図 QT 間隔延長作用の有無を検討することが求められている。薬物の投与によって引き起こされる QT 間隔延長に伴う、心室性頻脈、torsades de pointes、および致死的な不整脈から患者を保護するために、このような重篤な副作用を誘発する可能性を有する QT 間隔延長作用を検出することは、医薬品開発において非常に重要である。

これまでに、QT 間隔延長作用を有する多くの医薬品は、心筋細胞遅延型整流カリウムチャネルを抑制することが知られており、hERG (human ether-a-go-go related gene) チャネルがそのチャネルの主たる構成タンパクとして機能していると考えられている。従って、ヒト用医薬品による心室再分極遅延 (QT 間隔延長) の潜在的可能性を評価するためのガイドライン (ICH-S7B) 案では、非臨床試験として hERG チャネルを導入した細胞を用いたイオンチャネルアッセイが推奨されている。

従来、hERG チャネルに対する化合物の作用を適切に評価する方法として、

hERG チャネルを発現させた細胞または hERG チャネルを本来保持している心筋細胞に対して直接ガラス微小電極を用いてチャネル活性を記録するパッチクランプ法が用いられてきた (Neher, E. and Sakmann, B. Nature vol 260, 779-802, (1976))。しかし、このパッチクランプ法は、高い精度で hERG チャネルに対する薬物の評価を適切に行えるものであるが、熟練した高度な技術を必要とするものであり、その処理能力は著しく低く (1-5 化合物/日/人)、薬剤開発段階での数多くの薬剤候補化合物に対して処理能力が著しく不足しているという問題があった。

一方、hERG チャネルの評価の処理能力を高める方法として、放射性同位元素である Rb<sup>3+</sup>の放出を検出する方法 (Cheng, C.S. et al. Drug Dev. Ind. Pharm. vol.28, 177-191, (2002))、放射性同位元素であるトリチウム(<sup>3</sup>H)で標識した dofetilide の結合との競合により評価する方法 (Finlayson, K. et al. Eur. J. Pharm. vol.430, 147-148 (2001))、および膜電位感受性色素を利用した方法 (Tang, W. et al. J.Biomol.Screen vol.6, 325-331 (2001)、Baxter, D. F. et al. ibid. vol.7, 79-85 (2003)) などが報告されている。しかし、これらの方法は、放射性物質を用いる点で操作が煩雑であり、また、間接的な検出方法であるために感度および精度が低くなることから、パッチクランプ法で得られる hERG チャネル阻害活性の測定精度と大きく乖離していた。

近年、上記問題点を解決する手段として hERG チャネルによる影響を適切に評価しつつ処理能力の高い機器である全自動ハイスループットパッチクランプシステムが開発されており、その中のいくつかの機器(IonWorks HT<sup>TM</sup>; Molecular Device 社、PatchXpress<sup>TM</sup> 7000A; Axon Instruments 社)が発売されている。これらの装置は、hERG チャネルを発現した細胞を浮遊状として、重力による落下および陰圧によって、各ウェルの中央にある小径の穴へ細胞を吸引し、電流記録可能な状態にするものであるため、パッチクランプ法のように熟練した高度な技術を必要としない。また、化合物の処理能力も非常に高く、1 日に 3000 ポイント以上のデータを取得することができる。ただし、この装置を用いて評価するに

当たっては、実験に用いる hERG チャネル発現細胞が非常に重要になる。すなわち、古典的なパッチクランプ法による測定では、細胞 1 つ 1 つを選択して評価するため、hERG チャネルの発現量の高い細胞を選び出して測定することができるのに対し、全自動ハイスループットパッチクランプシステムによる測定では、存在する細胞をランダムに使用するために発現量の高い細胞を選ぶことができない。  
5 従って、全自動ハイスループットパッチクランプシステムにより多検体を正確に評価するためには、一定割合以上の細胞が hERG チャネルを発現していること、かつ、その発現量も十分に多いことが求められる。そこで、この全自動ハイスループットパッチクランプシステムで使用できる hERG チャネル発現細胞を作製  
10 するために、種々の試みがなされている。

これまでの報告では、ある細胞にリン酸カルシウム法やリポフェクション法を用いたトランスフェクションにより hERG 遺伝子を細胞に導入し、限界希釈によるクローニングおよび hERG 遺伝子導入量確認、あるいは hERG チャネルによる電流測定等の著しく労働消費的な手順を経て安定発現細胞を得ていた (Tang,  
15 W. et al. J.Biomol.Screen. vol.6 325-331 (2001)、Assay and Drug Development Technologies. 1(2-3), 127-135, 2003.)。しかしながら、限界希釈によるクローニングという大変な労力を割いても、これらの手法では hERG 遺伝子導入量が充分でないため、細胞あたりの hERG 電流は微弱なものとなる。hERG 電流が小さい場合には、十分な S/N 比を取ることができず、その分測定感度は低下することになる。  
20 また、クローニングによりいかに hERG 電流の大きな細胞を取得しても、全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いた場合、その hERG 電流の大きさを高感度に測定することが困難であることが多い。

また、hERG チャネルが分類されるイオンチャンネルの電流の測定では、細胞が内在的にもついオノンチャンネルの影響が細胞種毎に異なるために、細胞種を変  
25 えることで測定実用度が大きく影響を受けることが多く、そのために、別種の細胞で測定を行う際にも上記と同様の労働消費的な操作を繰り返す必要があった。

## 発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、薬剤研究開発における hERG チャネル阻害に基づく副作用を予測するための発現レベルの著しく高い hERG チャネル発現細胞の樹立法を確立し、それにより、高感度かつ高処理能力を有する被験物質評価法を確立するものである。

本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意検討を重ねた結果、hERG 遺伝子をレトロウイルスベクタープラスミドまたはレンチウイルスベクタープラスミドに挿入し、ウイルスベクターを調製後、必要に応じて超遠心による濃縮を行い、細胞に hERG 遺伝子を導入することにより、hERG チャネルを高発現する細胞を得ることに成功した。また、この細胞は、全自動ハイスループットパッチクランプシステムまたは色素を用いた測定法において有効な発現量を確保し得るものであることを見出し、本発明を完成させた。

すなわち本発明は、以下に関する。

(1) 全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法により測定される hERG 電流が 0. 6 nA 以上のチャネルを発現することができる細胞を、hERG 遺伝子が導入された細胞全体の 40 % 以上含む hERG チャネル発現細胞集団。

(2) hERG 遺伝子の導入がウイルスベクターによるものである (1) 記載の細胞集団。

(3) ウイルスベクターがレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターである (2) 記載の細胞集団。

(4) hERG 電流の細胞全体の平均が 0. 3 nA 以上である (1) から (3) のいずれか 1 項に記載の細胞集団。

(5) 全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法により測定される hERG 電流が 1. 0 nA 以上の hERG チャネルを発現することができる細胞。

(6) hERG 遺伝子の導入がウイルスベクターによるものである (5) 記載の細

胞。

(7) ウイルスベクターがレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターである (6) 記載の細胞。

(8) ウイルスベクターを用いて hERG チャネルを発現させることを特徴とする、

5 (1) から (4) のいずれか 1 項に記載の細胞集団または (5) から (7) のい  
ずれか 1 項に記載の細胞を作製する方法。

(9) ウイルスベクターがレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクタ  
ーである (8) 記載の方法。

(10) ウイルスベクターがレトロウイルスベクターである (8) 記載の方法。

10 (11) ウイルスベクターを超遠心により濃縮する工程を含むことを特徴とする、  
(8) から (10) のいずれか 1 項に記載の方法。

(12) (1) から (4) のいずれか 1 項に記載の細胞集団または (5) から (7)  
のいずれか 1 項に記載の細胞を用いることを特徴とする、hERG 電流の阻害活性  
を測定する方法。

15 (13) 全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いることを特徴と  
する (12) 記載の方法。

(14) (8) から (11) のいずれか 1 項に記載の方法により作製された細胞集  
団または細胞を用いることを特徴とする、hERG 電流の阻害活性を測定する方法。

(15) 全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いることを特徴と  
20 する (14) 記載の方法。

(16) (1) から (4) のいずれか 1 項に記載の細胞集団または (5) から (7)  
のいずれか 1 項に記載の細胞を用いることを特徴とする、hERG 電流を変化させ、  
もしくは変化させない化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(17) 全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いることを特徴と  
25 する (16) 記載の方法。

(18) (8) から (11) のいずれか 1 項に記載の方法により作製された細胞集  
団または細胞を用いることを特徴とする、hERG 電流を変化させ、もしくは変化

させない化合物またはその塩のスクリーニング方法。

(19) 全自動ハイスクループットパッチクランプシステムを用いることを特徴とする(18)記載の方法。

本発明により、薬剤研究開発における hERG チャネル阻害に基づく副作用を予測するための発現レベルの著しく高い、hERG チャネル発現細胞の樹立法を確立し、それにより高感度で処理能力の高い評価を可能とした。

本発明により、同時に効率よく hERG チャネルの高発現細胞を得られることを利用して、多様な細胞種に対して hERG チャネルを高レベルで発現させることにより、各細胞種間で内在性のイオンチャネルの影響を比較することで、薬剤研究開発における副作用予測を行う上で最も適切な細胞種を選択することを可能としている。また、本発明の hERG チャネル発現細胞または hERG チャネル発現細胞集団は、長期間安定的に hERG チャネルを発現することができる。

#### 図面の簡単な説明

15 図 1 は、レトロウイルスベクタープラスミド (pBabeXIP) の構造を示す。

図 2 は、レトロウイルスベクタープラスミド (pBabeXIH) の構造を示す。

図 3 は、レトロウイルスベクタープラスミド (pBabeCLXIP) の構造を示す。

図 4 は、レトロウイルスベクタープラスミド (pBabeCLXIH) の構造を示す。

図 5 は、レトロウイルスベクタープラスミド (pBabeCLXI2G) の構造を示す。

20 図 6 は、レトロウイルスベクタープラスミド (pBabeCLXaIN) の構造を示す。

図 7 は、hERG 遺伝子を導入したレトロウイルスベクタープラスミド (pBabeCL(hERG)aIN) の構造を示す。

図 8 は、hERG 遺伝子を導入したレトロウイルスベクタープラスミド (pBabeCL(hERG)IH) の構造を示す。

25 図 9 は、hERG 遺伝子を導入したレトロウイルスベクタープラスミド (pBabeCL(hERG)IP) の構造を示す。

図 10 は、hERG 遺伝子を導入したレトロウイルスベクタープラスミド

(pBabeCL(hERG)I2G) の構造を示す。

図 1 1 は、 hERG 遺伝子を導入したレトロウイルスベクタープラスミド (pBabeCL(hERG)) の構造を示す。

図 1 2 は、レンチウイルスベクタープラスミド (pLenti6/MCS) の構造を示す。

5 図 1 3 は、レンチウイルスベクタープラスミド (pLenti6/cPPT-XI2G) の構造を示す。

図 1 4 は、 hERG 遺伝子を導入したレンチウイルスベクタープラスミド (pLenti6/cPPT-(hERG)I2G) の構造を示す。

10 図 1 5 は、ウェスタンプロット法による hERG チャネルタンパクの検出結果を示す。(Lane1: normal CHO-K1 細胞、Lane2: リポフェクション法により hERG 遺伝子を導入した細胞株、Lane3: レトロウイルスにより hERG 遺伝子を導入した細胞株)

15 図 1 6 は、 hERG 電流の分布を表す。(A: リポフェクション法により hERG 遺伝子を導入した細胞株、B: レトロウイルスにより hERG 遺伝子を導入した細胞、C: レトロウイルスにより hERG 遺伝子を導入した細胞株)

図 1 7 は、カットオフ値を設定して解析した hERG 電流の分布を示す。(A: リポフェクション法により hERG 遺伝子を導入した細胞株、B: レトロウイルスにより hERG 遺伝子を導入した細胞、C: レトロウイルスにより hERG 遺伝子を導入した細胞株、D: レンチウイルスにより hERG 遺伝子を導入した細胞群)

20 図 1 8 は、既知化合物の hERG 阻害活性を表す。

図 1 9 は、KCl および hERG 阻害剤である E4031 および Dofetillide による膜電位変化を示す。

### 発明を実施するための最良の形態

25 以下に本発明の実施の形態について説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態にのみ限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、さまざまな形態で実施をすることが

できる。

本発明において、レトロウイルスベクタープラスミドまたはレンチウイルスベクタープラスミドを利用して hERG 遺伝子を含むウイルスベクターを調製し、得られたウイルスベクターによって細胞に hERG チャネルを高発現させることができる。本発明は、全自動ハイスループットパッチクランプシステムまたは色素を用いた測定法において、本発明により得られる hERG チャネル発現細胞または細胞集団を用いることにより、hERG 電流を阻害する物質を同定することができる。また、本発明の hERG チャネル発現細胞または hERG チャネル発現細胞集団は、長期間安定的に hERG チャネルを発現することができる。

10 本発明において、パッチクランプ法とは、細胞膜上に存在するイオンチャネルを通過するイオンの流れを高感度で検出する手法である（新パッチクランプ実験技術法、岡田泰伸編、吉岡書店）。また、本発明において古典的なパッチクランプ法とは、高度な技術を要する研究員が、顕微鏡観察下で、直径 0.5~3 μm のガラス微小電極を細胞に押し当てて、非常に高い抵抗状態を作り上げた後にそのパッチを破壊することで、細胞膜表面上に存在するイオンチャネルを流れる電流を記録するホールセルパッチクランプ法である。

15 本発明において、全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法とは、細胞を PBS 等に浮遊状態で測定装置にセットし、アンフォテリシン B 等を用いて細胞膜表面に穿孔を形成させ、細胞表面に存在するイオンチャネルを通じて流れるイオンの動きを電流として検出する穿孔ホールセルパッチクランプ法である。

20 本発明において、全自動ハイスループットパッチクランプシステムとは、浮遊状にした細胞を、重力による落下および陰圧によって、各ウェルの小径の穴へ吸引し、電流記録を可能とする装置をいう。全自動ハイスループットパッチクランプシステムとしては、例えば、IonWorks HT™ (Molecular Device 社)、PatchXpress™ 7000A (Axon Instruments 社) があげられる。

25 本発明において、hERG チャネルとは、心筋細胞における遅延整流型カリウム

チャネルの構成タンパク質の一つであり、詳細については後述する。

本発明において、hERG 電流とは、細胞膜表面に存在する hERG チャネルを流れるカリウムイオンの流れのことである。このチャネルは、心臓において、心筋細胞の電気的な興奮を鎮めるために重要な役割を担っている。また、この hERG 電流を抑制する薬剤は、重篤な心室性不整脈を誘発する危険性があるという理由により、市場からの撤退を余儀無くされる。従って、新規薬剤の開発において、この hERG チャネルに対する作用がない、もしくは極力弱い薬剤の開発が必須となっている。

本発明において、全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法によって測定される hERG 電流とは、hERG チャネルを発現した細胞の膜電位を変化させた時に観察されるイオン電流をいう。より具体的には、細胞の膜電位を -80mV から +20mV へ 1 秒間、引き続き -50mV に 1 秒間変化させた時に検出されるイオン電流であり、この hERG 電流の大きさとしては、-50mV に変化させた時に観察される末尾電流のピーク値を hERG 電流の大きさとする。

本発明において、hERG チャネル発現細胞とは、hERG チャネルを発現している細胞をいう。以下に hERG チャネル発現細胞または細胞集団の作製方法を記載する。

#### < hERG チャネル >

本発明において細胞に発現させる hERG チャネルは、配列番号 2 (GenBank アクセッション番号 U04270) で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（以下、本発明のポリペプチドと称する場合がある）を含むものである。

以下、本発明のポリペプチドについて詳細に説明する。

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と約 90 % 以上、好ましくは約 95 % 以上、より好ましくは約 98 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、hERG 活

性を有するポリペプチドのアミノ酸配列などがあげられる。

特に、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、上記のアミノ酸配列の他、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列において1個または複数個（例えば1個または数個）のアミノ酸に欠失、置換または付加等の変異が生じたアミノ酸配列であって、hERG活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列である。

配列番号：2で表わされるアミノ酸配列において1個または複数個（例えば1個または数個）のアミノ酸に欠失、置換または付加等の変異が生じたアミノ酸配列としては、例えば、(i) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号2で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、(v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

また、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなる変異ポリペプチドであって、元のポリペプチドと同じ生物学的活性が維持されるポリペプチドも、本発明の範囲に含まれる (Mark et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-6; Zoller and Smith (1982) Nucleic Acids Res. 10: 6487-500; Wang et al. (1984) Science 224: 1431-3; Dalbadie-McFarland et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6409-13)。

ここで、アミノ酸の置換とは、配列中のアミノ酸残基の一つ以上が、異なる種類のアミノ酸残基に変えられた変異を意味する。このような置換により本発明のhERG遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を改变する場合、タンパク質の機

能を保持する必要がある場合には、保存的な置換を行うことが好ましい。保存的な置換とは、置換前のアミノ酸と似た性質のアミノ酸をコードするように配列を変化させることである。アミノ酸の性質は、例えば、非極性アミノ酸(Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val)、非荷電性アミノ酸(Asn, Cys, Gln, Gly, Ser, Thr, Tyr)、酸性アミノ酸(Asp, Glu)、塩基性アミノ酸(Arg, His, Lys)、中性アミノ酸(Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val)、脂肪族アミノ酸(Ala, Gly)、分枝アミノ酸(Ile, Leu, Val)、ヒドロキシアミノ酸(Ser, Thr)、アミド型アミノ酸(Gln, Asn)、含硫アミノ酸(Cys, Met)、芳香族アミノ酸(His, Phe, Trp, Tyr)、複素環式アミノ酸(His, Trp)、イミノ酸(Pro, 4Hyp)等に分類することができる。

従って、非極性アミノ酸同士、あるいは非荷電性アミノ酸同士で置換させることが好ましい。中でも、Ala、Val、Leu および Ile の間、Ser および Thr の間、Asp および Glu の間、Asn および Gln の間、Lys および Arg の間、Phe および Tyr の間の置換は、タンパク質の性質を保持する置換として好ましい。変異されるアミノ酸の数および部位は特に制限ない。

このような配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.」(Cold Spring Harbor Press (1989))、「Current Protocols in Molecular Biology」(John Wiley & Sons (1987-1997);特に Section 8.1-8.5)、Hashimoto-Goto et al. (1995) Gene 152: 271-5、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kramer and Fritz (1987) Method. Enzymol. 154: 350-67、Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85: 2763-6 等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製することができる。

また、ポリヌクレオチドに変異を導入するには、Kunkel 法や Gapped duplex 法等の公知手法により、部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット、例えば QuikChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit (ストラタジーン社製)、

GeneTailor<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis System (インビトロジエン社製)、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System (Mutan-K、Mutan-Super Express Km 等：タカラバイオ社製) 等を用いて行うことができる。

本発明のポリペプチドを構成するアミノ酸残基は天然に存在するものでも、また修飾されたものであっても良い。アミノ酸残基の修飾としては、アシル化、アセチル化、アミド化、アルギニル化、GPI アンカー形成、架橋、 $\gamma$ -カルボキシリ化、環化、共有架橋の形成、グリコシリ化、酸化、脂質または脂肪誘導体の共有結合化、ジスルフィド結合の形成、セレノイル化、脱メチル化、タンパク質の分解処理、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合化、ヒドロキシリ化、ピログルタメートの形成、フラビンの共有結合化、プレニル化、ヘム部分の共有結合化、ホスファチジルイノシトールの共有結合化、ホルミル化、ミリストイル化、メチル化、ユビキチン化、ヨウ素化、ラセミ化、ADP-リボシル化、硫酸化、リン酸化等が例示される。

さらに、本発明のポリペプチドには他のペプチド配列により付加された融合タンパク質を含む。本発明のポリペプチドに付加するペプチド配列としては、インフルエンザ凝集素(HA)、グルタチオン S トランスフェラーゼ(GST)、サブスタンス P、多重ヒスチジンタグ(6×His、10×His 等)、プロテイン C 断片、マルトース結合タンパク質(MBP)、免疫グロブリン定常領域断片、 $\alpha$ -チューブリン断片、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、B-タグ、c-myc 断片、E-タグ(モノクローナルファージ上のエピトープ)、FLAG(Hopp et al. (1988) Bio/Tehcnol. 6: 1204-10)、lck タグ、p18 HIV 断片、HSV-タグ(ヒト単純ヘルペスウイルス糖タンパク質)、SV40T 抗原断片、T7-タグ(T7 gene10 タンパク質)、VSV-GP 断片(Vesicular stomatitis ウィルス糖タンパク質)等のタンパク質の識別を容易にする配列、組換え技術によりタンパク質を発現させる際に安定性を付与する配列等を選択することができる。

本発明のポリペプチドとしては、以上のようなポリペプチドがあげられ、例えば、前記の配列番号 2 で表されるアミノ酸配列、あるいは前記の配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号 2 で表され

るアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同質の hERG 活性を有するポリペプチドなどが好ましい。ここで、「hERG 活性」とは、カリウムイオンチャネルとして機能する活性を意味する。実質的に同質の活性とは、その活性が性質的に（例、生理化学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。

5

#### <hERG 遺伝子>

本発明において、hERG 遺伝子とは、hERG チャネルをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドをいう。本発明の hERG 遺伝子は、配列番号 1 (GenBank アクセッション番号 U04270) で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含むものである。配列番号 1 で表される塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有するポリヌクレオチドは、前記本発明のポリペプチドをコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドであれば何でもよい。例えば、配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドのほか、配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなる変異ポリペプチドであって、hERG 活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明において使用することができる。

ここで、「ポリヌクレオチド」とは、複数のデオキシリボ核酸 (DNA) またはリボ核酸 (RNA) 等の塩基または塩基対からなる重合体を指し、DNA、cDNA、ゲノム DNA、化学合成 DNA および RNA を含む。また、天然以外の塩基を必要に応じて含むポリヌクレオチドも包含する。天然以外の塩基としては、例えば、4-アセチルシチジン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン、2'-O-メチルシチジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン、ジヒドロウリジン、2'-O-メチルブソイドウリジン、 $\beta$ -D-ガラクトシルキュエオシン、2'-O-メチルグアノシン、イノシン、N6-イソペニルアデノシン、1-メチルアデノシン、1-メチルブソイドウリジン、1-メチルグアノシン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアノシン、2-メチルアデノシン、

2-メチルグアノシン、3-メチルシチジン、5-メチルシチジン、N6-メチルアデノシン、7-メチルグアノシン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン、 $\beta$ -D-マンノシルキュエオシン、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン、5-メトキシカルボニルメチルウリジン、5-メトキシウリジン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、N-((9- $\beta$ -D-リボフラノシル-2-メチルリオプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、N-((9- $\beta$ -D-リボフラノシルプリン-6-イル)N-メチルカルバモイル)トレオニン、ウリジン-5-オキシ酢酸-メチルエステル、ウリジン-5-オキシ酢酸、ワイプトキソシン、プソイドウリジン、キュエオシン、2-チオシチジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メチルウリジン、N-((9- $\beta$ -D-リボフラノシルプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、2'-O-メチル-5-メチルウリジン、2'-O-メチルウリジン、ワイプトシン、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン等が挙げられる。

本発明の hERG 遺伝子は、配列番号 1 で表される塩基配列の遺伝子多型を含む。遺伝子多型は、データベース、例えば、GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) を利用することにより、容易に知ることができる。遺伝子多型には、一塩基多型 (SNP)、および塩基配列の繰り返し数が異なっていることにより生じる多型が含まれる。また、複数の塩基（例えば 2 個～数十塩基）の欠失または挿入による多型も遺伝子多型に含まれる。さらに、2～数十塩基の配列が繰り返されている多型も遺伝子多型に含まれる。このような多型として、VNTR(variable number of tandem repeat)（繰り返しの単位が数塩基から数十塩基のもの）、およびマイクロサテライト多型（2～4 塩基単位程度のもの）がある。

本発明の hERG 遺伝子は、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む。このようなアミノ酸配列をコードする塩基配列は、配列番号 1 で表される塩基配列に加えて、遺伝子暗号の縮重により配列番号 1 で表される塩基配列とは異なる塩基配列を含むものである。配列番号 1 で表される塩基配列のほか、非コード領域を除いた領域のみであってもよい。本発明のポリヌクレオチドを遺伝子工学的な手法によりポリペプチドを発現させるのに用いる場合、使用す

る細胞のコドン使用頻度を考慮して、発現効率の高いヌクレオチド配列を選択し、設計することができる(Grantham et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9: 43-74)。

さらに、本発明の hERG 遺伝子は、配列番号 1 で表される塩基配列または該塩基配列に相補的な配列に対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズする  
5 ポリヌクレオチドであって、hERG 活性を有するポリペプチドをコードするポリ  
ヌクレオチドを含む。このようなポリヌクレオチドとしては、アイソフォーム、  
アルタナティブアイソフォーム、およびアレリック変異体があげられ、これらは、  
本発明の hERG 遺伝子に含まれる。このような hERG 遺伝子は、配列番号 1 で  
表される塩基配列からなるポリヌクレオチド、またはその断片をプローブとして、  
10 コロニーハイブリダイゼーション、ブラークハイブリダイゼーション、サザンブ  
ロット等の公知のハイブリダイゼーション法により、ヒトの cDNA ライブラリー  
およびゲノムライブラリーから得ることができる。cDNA ライブラリーの作製方  
法については、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.」(Cold Spring  
Harbor Press (1989))を参照することができる。また、市販の cDNA ライブラリ  
15 一およびゲノムライブラリーを用いてもよい。

より具体的に、cDNA ライブラリーの作製においては、まず、本発明の hERG  
遺伝子を発現する細胞、臓器、組織等からグアニジン超遠心法 (Chirwin et al.  
(1979) Biochemistry 18: 5294-9)、AGPC 法 (Chomczynski and Sacchi (1987)  
Anal. Biochem. 162: 156-9) 等の公知の手法により全 RNA を調製し、mRNA  
20 Purification Kit (Pharmacia) 等を用いて mRNA を精製する。Quick Prep mRNA  
Purification Kit (Pharmacia) 等の、細胞、臓器、組織等から直接 mRNA を調製  
するためのキットを利用してもよい。次に得られた mRNA から逆転写酵素を用  
いて cDNA を合成する。AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA  
Synthesis Kit (生化学工業) のような cDNA 合成のためのキットを使用すること  
25 もできる。その他の方法として、cDNA は PCR を利用した 5'-RACE 法 (Frohman  
et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002; Belyavsky et al. (1989)  
Nucleic Acids Res. 17: 2919-32) により合成、および増幅させてもよい。また、

全長率の高い cDNA ライブラリーを作製するために、オリゴキヤップ法 (Maruyama and Sugano (1994) Gene 138: 171-4; Suzuki (1997) Gene 200: 149-56) 等の公知の手法を採用することもできる。上述のようにして得られた cDNA は、適当なベクター中に組み込むことができる。

5 本発明におけるハイブリダイゼーション条件において、ストリンジエントな条件としては、例えば、「 $2\times$ SSC、0.1%SDS、50°C」、「 $2\times$ SSC、0.1%SDS、42°C」、「 $1\times$ SSC、0.1%SDS、37°C」、よりストリンジエントな条件としては、例えば「 $2\times$ SSC、0.1%SDS、65°C」、「 $0.5\times$ SSC、0.1%SDS、42°C」、「 $0.2\times$ SSC、0.1%SDS、65°C」等の条件を挙げることができる。より詳細には、Rapid-hyb  
10 buffer(Amersham Life Science)を用いた方法として、68°Cで30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、プローブを添加して1時間以上68°Cに保ってハイブリッド形成させ、その後、 $2\times$ SSC、0.1%SDS 中、室温で20分の洗浄を3回、 $1\times$ SSC、0.1%SDS 中、37°Cで20分の洗浄を3回、最後に、 $1\times$ SSC、0.1%SDS 中、50°Cで20分の洗浄を2回行うことも考えられる。その他、例えば  
15 Expresshyb Hybridization Solution (CLONTECH)中、55°Cで30分以上プレハイブリダイゼーションを行い、標識プローブを添加し、37~55°Cで1時間以上インキュベートし、 $2\times$ SSC、0.1%SDS 中、室温で20分の洗浄を3回、 $1\times$ SSC、0.1%SDS 中、37°Cで20分の洗浄を1回行うこともできる。ここで、例えば、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションや2度目の洗浄の際の温度  
20 を上げることにより、よりストリンジエントな条件とすることができます。例えば、プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションの温度を60°C、さらにストリンジエントな条件としては68°Cとすることができます。当業者であれば、このようなバッファーの塩濃度、温度等の条件に加えて、他のプローブ濃度、プローブの長さ、反応時間等の諸条件を加味し、本発明の hERG 遺伝子をコード  
25 するポリヌクレオチドを得るための条件を設定することができる。

ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.」(Cold Spring Harbor Press (1989); 特に

Section9.47-9.58)、「Current Protocols in Molecular Biology」(John Wiley & Sons (1987-1997);特に Section6.3-6.4)、「DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach 2nd ed.」(Oxford University (1995);条件については特に Section2.10) 等を参照することができる。ハイブリダイズするポリヌクレオチドとしては、配列番号 1 で表される塩基配列に対して少なくとも 50%以上、好ましくは 70%、さらに好ましくは 80%、より一層好ましくは 90%(例えば、95%以上、さらには 99%)の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。このような同一性は、BLAST アルゴリズム(Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいたプログラムのうち、配列の同一性を決定するプログラムとして、アミノ酸配列については BLASTX、ヌクレオチド配列については BLASTN (Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10) 等が開発されており、本発明の配列に対して使用することができる。具体的な解析方法については、例えば、  
15 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>等を参照することができる。

本発明の hERG 遺伝子に含まれる hERG のアイソフォームやアレリック変異体等、hERG と類似した構造および機能を有する遺伝子は、配列番号 1 で表される塩基配列を基にプライマーを設計し、ヒトの cDNA ライブラリーおよびゲノムライブラリーから遺伝子増幅技術 (PCR) (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 6.1-6.4)により得ることができる。

本発明のポリヌクレオチドには、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において  
1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチド配列に相補的な配列が含まれる。これら本発明のポリヌクレオチドは、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.」(Cold Spring Harbor Press (1989))、「Current Protocols in Molecular Biology」(John Wiley & Sons (1987-1997);特に Section8.1-8.5)、Hashimoto-Goto et al. (1995) Gene 152: 271-5、Kunkel (1985)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kramer and Fritz (1987) Method. Enzymol. 154: 350-67、Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85: 2763-6 等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製することができる。また、変異の誘発は前記の通り市販のキットを用いることもできる。

5 本発明のポリヌクレオチドの塩基配列の確認は、慣用の方法により配列決定することにより行うことができる。例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法(Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463) 等により行うことができる。また、適当な DNA シークエンサーを利用して配列を解析することも可能である。

10

<ウイルスベクタープラスミド>

本発明により、本発明の hERG 遺伝子を含むウイルスベクタープラスミド（以下、本発明のウイルスベクタープラスミドと称する場合がある）が提供される。ここで、ウイルスベクタープラスミドとは、ウイルス由来の塩基配列を利用して、15 任意の塩基配列を任意の細胞に組み込むことができるようになしたプラスミドをいう。本発明のウイルスベクタープラスミドは、本発明の hERG 遺伝子を宿主細胞内に保持したり、該 hERG 遺伝子にコードされる hERG チャネルを発現させたりするのに有用である。

ウイルスベクタープラスミドを使用する場合に基となるウイルスとしては、モロニーマウス白血病ウイルス (Moloney murine leukemia virus, MoMLV) などのオンコレトロウイルス由来のものや、ヒト後天性免疫不全症候群ウイルス (Human immunodeficiency virus, HIV) などのレンチウイルス由来のものが挙げられる。

本発明において、レトロウイルスとは、レトロウイルス科 (Retroviridae)、オシンコウイルス亜科 (Oncovirinae) のオンコウイルス属 (Oncovirus) に属するウイルスをいい、レンチウイルスとは、レトロウイルス科 (Retroviridae)、レンチウイルス亜科 (Lentivirinae) のレンチウイルス属 (Lentivirus) に属するウイ

ルスをいう。

これまでにレトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターにより効率良く細胞の染色体中に安定した遺伝子導入・発現が可能であることが示されている(Kay, M.A. et al. Nature Med. vol.7 33-40 (2001))。本発明のウイルスベクタープラスミドには、pZIPneo (Cepko, C.L. et al (1984) Cell. 37: 1053-1062)、pBabe Puro (Morgenstern, J.P. and Land, H. Nucleic Acids Res. vol.18 3587-3596)、pCLXSN (IMGENEX社 catalog 10041P)、ViraPort retroviral gene expression system (Stratagene catalog 217563)、pDON-AI (Takara catalog 3650)等のレトロウイルスベクタープラスミド、pLenti6/V5-GW/lacZ (Invitrogen, Carlsbad, CA. catalog K4955-10) 等のレンチウイルスベクタープラスミド等様々なウイルスベクタープラスミドを用いることができる。また、レトロウイルスおよびレンチウイルス以外由来のウイルスベクター、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(adeno-associated viral vector)、シンビスウイルス、センダイウイルス、トガウイルス、パラミクソウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス等を元に作製されたベクタープラスミドを利用することもできる。

レトロウイルスベクターの中では、VSV-G シュードタイプレトロウイルスベクターを使用することが望ましい。シュードタイプとは、一つのウイルスゲノムが別種のウイルスの外皮タンパク質に囲まれて発芽してくる現象である(Zavada, J. J.Gen.Virology vol.15 183-191 (1972))。VSV (水疱性口内炎ウイルス : vesicular stomatitis virus, VSV) は、ラブドウイルス科に属するネガティブ 1 本鎖 RNA ゲノムを持つウイルスであり、その外皮タンパク質 (G タンパク質) の細胞側のレセプターはホスファチジルセリンをはじめとする陰イオン脂質であると考えられ(Schlegel, R. et al. Cell vol.32 639-646 (1983), Mastromarino, P. et al. J. Gen. Virol. vol.68 2359-2369 (1987))、通常用いられる両種指向性 (amphotropic) のレトロウイルスベクターに比較してきわめて広い宿主域を有する(Emi, N. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol.65 1202-1207 (1991), Arai, T. et al. Virol. vol. 260

109-115 (1999))と共に超遠心操作により遺伝子導入能力を向上できることが報告されている(Burns, J.C. et al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA vol.90 8033-8037 (1993))。従って、このVSV-G 遺伝子産物を外皮を持つシードタイプレトロウイルスを作製することにより、本来の外皮タンパク質を持つレトロウイルスに比較して効率よく各種細胞に hERG 遺伝子を導入することが可能となる。

これら VSV-G シードタイプベクターの性質はレンチウイルスベクターにおいても同様であり、報告されているレンチウイルスベクターの多くがこのシードタイプベクターである(Kay, M.A. et al. Nature Med. vol.7 33-40 (2001))。

ウイルスベクタープラスミドの好ましい態様においては、ウイルスベクタープラスミドを導入した宿主細胞内で本発明の hERG 遺伝子が発現されるように制御配列下に結合する。ここで「制御配列」とは、プロモーターおよびターミネーターであり、場合によってトランスアクチベーター、転写因子、転写物を安定化するポリ A シグナル、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル等が含まれる。このような制御配列は、それに連結されたポリヌクレオチドの発現に必要とされるすべての構成成分を含むものである。

また、本発明のウイルスベクターは、選択可能なマーカーを含んでいてもよい。選択可能なマーカーとしては、例えば、薬剤耐性遺伝子（ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子等）や蛍光タンパク質（GFP、EGFP 等）などが挙げられる。さらに、細胞内で発現されたポリペプチドを細胞膜上へと移行させるために必要とされるシグナルペプチドをポリペプチドに付加するようにしてウイルスベクタープラスミドへ組み込むこともできる。さらに、必要に応じリンカーの付加、開始コドン(ATG)、終止コドン(TAA、TAG または TGA)の挿入を行ってもよい。

哺乳動物およびその他の動物細胞を宿主とする場合には、アデノウイルス late プロモーター(Kaufman et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 946)、CAG プロモーター(Niwa et al. (1991) Gene 108: 193-200)、CMV immediate early プロモーター(Seed and Aruffo (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3365-9)、EF1 $\alpha$  プロモ

ーター(Mizushima et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 5322; Kim et al. (1990) Gene 91: 217-23)、HSV TK プロモーター、SR $\alpha$ プロモーター(Takebe et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466)、SV40 プロモーター(Mulligan et al. (1979) Nature 277: 108)、SV40 early プロモーター(Genetic Engineering Vol.3, 5 Williamson ed., Academic Press (1982) pp.83-141)、SV40 late プロモーター(Gheysen and Fiers (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1: 385-94)、RSV(ラウス肉腫ウイルス)-LTR プロモーター(Cullen (1987) Methods Enzymol. 152: 684-704)、MMLV-LTR プロモーター、CMV エンハンサー、SV40 エンハンサー、cPPT(central polypurine tract)配列およびグロビンイントロン等を使用するこ  
10 とができる。

15 ウィルスベクタープラスミドへの hERG 遺伝子の挿入は、リガーゼ反応により行うことができる。このとき、制限酵素サイトを利用することもできる(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11; Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989) Section 5.61-5.63)。

#### <ウィルスベクターの調製>

本発明において、ウィルスベクターとは、ウィルスベクタープラスミドを含有するウィルスをいう。ウィルスベクターを調製するために、ウィルスベクタープラスミドをパッケージング細胞に導入する。パッケージング細胞には、293-EBNA 細胞(Invitrogen, catalog R620-07)等を用いることができる。ウィルスベクタープラスミドは、アデノウイルス法、エレクトポレーション(電気穿孔)法(Cytotechnology 3: 133 (1990))、カチオニックリポソーム法(カチオニシクリポソーム DOTAP(Boehringer Mannheim)等)、正電荷ポリマーによる導入法、静電気型リポソーム(electrostatic type liposome)法、内包型リポソーム(internal type liposome)法、パーティクルガンを用いる方法、リポソーム法、リポフェクション法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 (1987) (例えば、lipofectamine 2000  
25

(Invitrogen)、Fugene 6 (Roche Diagnostics)など) )、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、レセプター介在遺伝子導入法、レトロウイルス法、DEAE デキストラン法、ウイルス・リポソーム法(別冊実験医学「遺伝子治療の基礎技術」羊土社(1997);別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社(1997); J. Clin. Invest. 93: 1458-64 (1994); Am. J. Physiol. 271: R1212-20 (1996); Molecular Medicine 30: 1440-8 (1993); 実験医学 12: 1822-6 (1994); 蛋白質核酸酵素 42: 1806-13 (1997); Circulation 92(Suppl.II): 479-82 (1995))、naked-DNA の直接導入法等によりパッケージング細胞に導入することができる。

パッケージング細胞を適当な培地にて培養し、上記方法によりウイルスベクタープラスミドをトランスフェクションし、その後、一定時間培養し、培養液を回収することでウイルスベクターを得ることができる。また、トランスフェクション後、必要に応じて2から24時間後、好ましくは6から12時間後に培地を交換することができる。培地を交換した後、さらに12時間から72時間培養し、培養液を回収することでウイルスベクターを得ることができる。回収した培養液は、必要に応じて遠心操作、フィルター ( $0.45 \mu m$  のフィルター(Millipore, MILLEX-HV, catalog#SLHV025LS)等) によるろ過を行うことができる。

#### <ウイルスベクターの濃縮>

本発明のウイルスベクターは、そのままでも用いることができるが、濃縮した方が、より好ましい。前記操作により得られたウイルスベクターを超遠心操作することで、濃縮ウイルスベクターを得ることができる。超遠心は、少なくとも $35,000g$  ( $g$  は重力加速度を表す) 以上、好ましくは $55,000g$  以上を、少なくとも100分以上、好ましくは120分以上行う。超遠心は、例えば、超遠心装置 XL-90 (Beckman) および超遠心ローターSW28 (Beckman) を用いて、19500 rpm, 100 分行うことによりできる。

#### <hERG 遺伝子の導入>

本発明において、hERG 遺伝子の細胞への導入は、本発明のウイルスベクターをそのまま用いることもできるが、濃縮したものを用いた方がより好ましい。

本発明の hERG チャネル発現細胞または hERG チャネル発現細胞集団における宿主細胞には、哺乳類由来の真核細胞を用いることができ、好ましくは、CHO 5 (中でも DHFR 遺伝子欠損 dhfr-CHO(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-20 (1980) および CHO K-1(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60: 1275 (1968)) が好適である)、COS、Hela、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowes メラノーマ細胞等である。また、本発明の hERG チャネル発現細胞または細胞集団における宿主細胞には、心臓由来のセルライン、または単離した心筋細胞若しくは洞房結節細胞を用 10 いることもできる。本発明の hERG 発現細胞または細胞集団には、一定条件下、例えば、薬剤刺激、電気刺激、熱刺激、光刺激などにより、転写を調節し、発現を調節することができる細胞も含まれる。

宿主細胞を培養し、培養液にウイルスベクターを添加し、さらに培養することで遺伝子導入することができる。ウイルスベクターは、濃縮したものを用いるのが好ましい。添加するウイルスベクターには、必要に応じて polybrene (Sigma 15 H9268 別名 hexadimethrine bromide) を加えることができる。ウイルスを加えた後、24 時間後に培地を交換することが好ましい。また、培地を交換した後、72 時間程度培養することで細胞あたりの発現量を最大とすることができる。

## 20 < hERG チャネル発現細胞、hERG チャネル発現細胞集団 >

以上の方針により、本発明の hERG チャネル発現細胞および hERG チャネル発現細胞集団が提供される。培養は、選択した細胞に適した公知の方法により行う。例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM、F12 等の培地を用い、必要に応じウシ胎児血清(FCS)等の血清、アミノ酸、グルコース、ペニシリソウまたは 25 ストレプトマイシンなどを添加することができ、pH 約 6~8、30~40°Cにおいて 15~200 時間前後の培養を行うことができる。その他、必要に応じ途中で培地の交換を行ったり、通気および攪拌を行ったりすることができる。

本発明の方法により得られた hERG 遺伝子導入細胞の細胞集団（以下、「本発明の hERG チャネル発現細胞集団」と称することがある）の中には、チャネル発現細胞（以下、本発明の hERG チャネル発現細胞と称することがある）が多数存在しており、中でも、本発明の hERG チャネル発現細胞集団は、全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法によって測定される hERG 電流が 0. 6 nA 以上の hERG チャネル発現細胞を多く含むものである。その含有率は、hERG 遺伝子が導入された細胞全体のうち、少なくとも 40% 以上、好ましくは 50% 以上、より好ましくは 60% 以上、特に好ましくは 70% 以上、最も好ましくは 80% 以上である。hERG 遺伝子が導入された細胞は、遺伝子の導入操作内容が同一の操作内容である限り、同一実験系で導入された細胞全体を母数としてもよく、異なる実験系（例えば異なる実験日に行われた場合等）で導入された細胞を全体にまとめて母数としてもよい。hERG チャネル発現細胞集団の hERG 電流の平均は 0. 3 nA 以上であり、好ましくは 0. 6 nA 以上であり、より好ましくは 0. 8 nA 以上であり、さらに好ましくは 1. 0 nA 以上である。

hERG チャネル発現細胞または細胞集団の全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法によって測定される hERG 電流は、後述のパッチクランプ法により測定することができる。なお、全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法によって測定される hERG 電流が 0. 6 nA 以上の hERG チャネル発現細胞の含有率は、無作為に選び出した複数の細胞それぞれについて、hERG 電流を測定することにより、hERG 電流が 0. 6 nA 以上の細胞の割合を算出することができる。

また、本発明の hERG チャネル発現細胞または本発明の hERG 発現細胞集団は、後述のクローニングにより得られる細胞、細胞株も含まれる。また、本発明の hERG チャネル発現細胞または本発明の hERG 発現細胞集団は、クローニングで得られた細胞株に、さらに hERG 遺伝子を導入して得られる細胞、細胞集団も含まれる。

## &lt; hERG チャネル発現細胞のクローニング &gt;

本発明の hERG チャネル発現細胞または細胞集団は、そのまま用いることも可能であるが、培養中に性質が偏ることを避け、安定した薬物評価を可能とするためにクローニングを行うことができる。細胞クローニングは、定法（例えば、限外希釈法、フローサイトメトリーによるセルソーティング等）により行うことができる。クローニング後の細胞株から、発現量の測定、パッチクランプ法による hERG チャネルの機能的解析により最適な hERG チャネル発現細胞株を選別することができる。

hERG チャネル発現細胞における発現量は、抗 hERG チャネル抗体を用いた免疫組織学的な解析方法により測定できる。抗体は、定法により作製してもよく、市販のもの（例えば、Alomene Labs）を用いてもよい。免疫組織学的な解析方法としては、例えば、酵素免疫測定法（EIA）、放射免疫測定法（RIA）、ELISA 法、Western blot 法、フローサイトメトリー、免疫組織化学染色等があげられる。

このクローニングにより、全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法により測定される hERG 電流が、少なくとも 0.4 nA 以上、好ましくは 0.6 nA 以上、さらに好ましくは 0.8 nA 以上、より好ましくは 1.0 nA 以上、特に好ましくは 1.2 nA 以上の細胞がより容易に提供される。

< hERG 電流の測定方法 >

本発明は、本発明の hERG チャネル発現細胞または本発明の hERG チャネル発現細胞集団を用いることを特徴とする hERG 電流を測定する方法、具体的には、本発明の hERG チャネル発現細胞または細胞集団を用いて、パッチクランプ法、好ましくは全自動ハイスループットパッチクランプシステムにより、hERG 電流を測定する方法を提供する。

hERG チャネル発現細胞または細胞集団は、前述の本発明の hERG チャネル発

現細胞を作製する方法などにより得ることができる。本発明の hERG 電流の測定方法において使用される hERG チャネル発現細胞の hERG チャネル発現量は、全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法により測定されるチャネル電流が、少なくとも 0.4 nA 以上、好ましくは 0.6 nA 以上、さらに好ましくは 0.8 nA 以上、より好ましくは 1.0 nA 以上、特に好ましくは 1.2 nA 以上であることが望ましく、当該細胞あるいは当該細胞集団も本発明の範囲に含まれる。なお、発現量が多いほどパッチクランプ法により測定されるチャネル電流が高くなる。

本発明の hERG 電流の測定方法を実施するためには、本発明の hERG チャネル発現細胞または細胞集団を、前述の適当な方法で一定期間培養し、測定に適したバッファーに懸濁する。バッファーは、pH 6～8 のリン酸バッファー、トリス・塩酸バッファーなどの hERG 電流に影響を与えないバッファーであれば何でもよい。好ましくは pH 7.4 の phosphate buffered saline である。

次に、パッチクランプ法、好ましくは全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いて、hERG 電流を記録することができる。hERG 電流は、種々の保持電位および脱分極パルスを細胞に与えることにより誘発することができる。これらの条件については、当業者であれば容易に設定することができる (Zhou, Z et al, Biophysical Journal, 74, 230-241 (1998))。例えば、保持電位を、-80 mV から +20 mV へ 1 秒間、続いて、脱分極パルスを -50 mV へ 1 秒間与えることにより誘発することができる。hERG 電流の大きさには、-50 mV へ 電位を戻した際に観察される末尾電流のピーク値を用いることができる。

#### <本発明の hERG チャネル発現細胞を用いた hERG 電流の阻害活性の測定方法>

hERG 電流の阻害活性を有する化合物は、QT 延長作用を伴う催不整脈作用を有することが知られており、心室頻拍や突然死といった重篤な副作用を誘発することがある。そのため、安全性の高い医薬品開発には、その開発の対象となる被

検物質が hERG 電流に影響を与えないことを確認することが必須である。よって、本発明の hERG チャネル発現細胞を用いた hERG 電流の阻害活性の測定方法は、hERG 電流に影響を与えない被検化合物を選択することを容易とするものであり、従って、本発明の阻害活性測定方法は、種々の疾病的治療・予防剤などの医薬の開発に有用である。

すなわち、本発明は、

(A) hERG チャネル発現細胞または hERG チャネル発現細胞集団を用いることを特徴とする hERG 電流の阻害活性の測定方法、具体的には、本発明の hERG チャネル発現細胞または細胞集団に、被検化合物を接触させることを特徴とする hERG 電流の阻害活性の測定方法を提供する。本発明の hERG 電流の阻害活性の測定方法においては、本発明の hERG チャネル発現細胞または細胞集団に、被検化合物を接触させる前と接触させた後における、例えば、当該細胞の hERG 電流を測定して比較することができる。たとえば、hERG 電流の阻害活性は、被検化合物を接触させる前の hERG 電流の大きさに対する当該化合物を接触させた後の hERG 電流の大きさの比を指標に用いることができる。

(B) hERG チャネル発現細胞または hERG チャネル発現細胞集団を用いることを特徴とする hERG 電流を変化させもしくは変化させない化合物またはその塩のスクリーニング方法、具体的には、本発明の hERG チャネル発現細胞または細胞集団に、被検化合物を接触させた場合と接触させない場合との比較を行うことを特徴とする hERG 電流を変化させもしくは変化させない化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法においては、本発明の hERG チャネル発現細胞または細胞集団に、被検化合物を接触させた場合と接触させない場合における、例えば、当該細胞の hERG 電流を測定して比較することができる。例えば、被検化合物を接触させない場合よりも接触させた場合の hERG チャネル電流が小さいとき、当該被検化合物を hERG チャネル電流を阻害する化合物とすることができます。

hERG チャネル発現細胞または細胞集団は、本発明の hERG 発現細胞、本発明

の hERG 発現細胞集団を用いることができ、あるいは前述の本発明の hERG チャネル発現細胞または細胞集団を作製する方法などにより得ることができる。本発明の hERG 電流の阻害活性の測定方法において、本発明の hERG チャネル発現細胞または細胞集団の hERG チャネル発現量は、全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法により測定されるチャネル電流が、少なくとも 0.4 nA 以上、好ましくは 0.6 nA 以上、さらに好ましくは 0.8 nA 以上、より好ましくは 1.0 nA 以上、特に好ましくは 1.2 nA 以上である。なお、発現量が多いほどパッチクランプ法により測定されるチャネル電流が高くなり、高感度な測定系の構築が可能になる。

10 本発明の (A) または (B) の前記の方法を実施するためには、本発明の hERG チャネル発現細胞または細胞集団を、前述の適当な方法で一定期間培養し、測定に適したバッファーに懸濁する。バッファーには、pH 6～8 のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどの hERG 電流に影響を与えないバッファーであれば何でもよい。好ましくは、pH 7.4 phosphate buffered saline である。

15 まず、パッチクランプ法、好ましくは全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いて、hERG 電流を記録することができる。hERG 電流は、種々の保持電位および脱分極パルスを細胞に与えることにより誘発することができる。これらの条件については、当業者であれば容易に設定することができる。例えば、保持電位を、-80 mV から +20 mV へ 1 秒間、続いて、脱分極パルスを -50 mV へ 20 1 秒間与えることにより誘発することができる。hERG 電流の大きさには、電位を戻した際に観察される末尾電流のピーク値を用いることができる。

次に、hERG チャネル発現細胞に被検化合物を共存させる。このとき、コントロールとして、被検化合物を含まないものや hERG 電流を阻害することが知られている化合物を加えた細胞も用意することができる。hERG 電流を阻害する化合物としては、アステミゾール (Talialat et al. (1998) Mol. Pharmacol. 54: 113-21)、E-4031 (Zhou et al. Biophys J. (1998) 74: 230-41)、リスペリドン (Kongsamut et al. Eur J Pharmacol. (2002) 450: 37-41))、ベラパミル (Zhang

et al. (1999) Circ. Res. 84: 989-98)、キニジン (Jiesheng et al. J Pharmacol Exp Ther. (2001) 299: 290-6.) があげられる。反応は、例えば、15°Cから37°C、好ましくは20°Cから30°Cで、10秒から60分、好ましくは3分から10分行う。

5 そして、パッチクランプ法、好ましくは全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いて、hERG 電流を記録することができる。hERG 電流は、被検化合物共存前と同条件により誘発することができる。hERG 電流の大きさには、電位を戻した際に観察される末尾電流のピーク値を用いることができる。

例えれば、被検化合物を接触させる前の hERG 電流の大きさを 100%、0 nA  
10 を 0% として、被検化合物を接触させた後の hERG 電流の大きさから抑制率を算出し、被検化合物の hERG 電流に対する阻害活性を測定できる。さらに、被検化合物の用量を変化させることで、被検化合物固有の阻害活性値を算出することも可能である。また、hERG 電流を 50% 阻害する濃度が、少なくとも 0.  
15 3 μM 以上、好ましくは 1.0 μM 以上、より好ましくは 3.0 μM 以上、特に好ましくは 10 μM 以上、最も好ましくは 30 μM 以上である場合には、hERG 電流に影響を与えない、あるいは阻害活性を有さないと判断することができる。

被検化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、  
20 これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

#### <本発明の hERG チャネル発現細胞による FLIPR Membrane Potential Assay Kit を用いた膜電位変化の測定方法>

本発明は、hERG チャネル発現細胞による FLIPR Membrane Potential Assay  
25 Kit (Molecular Devices) を用いた膜電位変化の測定方法を提供する。

具体的には、以下のように操作を行うことで、測定することができる。本発明の hERG チャネル発現細胞を、前述の適当な方法で一定期間培養し、測定に適し

たバッファーに懸濁する。バッファーには、pH 6～8のリン酸バッファー、トリス・塩酸バッファーなどの hERG 電流に影響を与えないバッファーであれば何でもよく、好ましくは、pH 7.4 phosphate buffered saline である。細胞懸濁液は、 $0.2 \times 10^5$  cells/ml から  $1.0 \times 10^6$  cells/ml の濃度に調製することが好ましい。

- 5 次に、懸濁した細胞をプレート（例えば、Biocoat Poly-D-Lysine 384-Well Black/Clear Plate (BECKTON DICKINSON) 等を利用する）に蒔き、さらに培養する。細胞は、500 cells/well から 25000 cells/well になるように蒔くことができる。また、2日間程度培養することが好ましい。次に、FLIPR Membrane Potential Assay Kit (Molecular Devices) の Component A を測定用緩衝液 (130 mM NaCl、5 mM KCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM CaCl<sub>2</sub>、24 mM Glucose、10 mM HEPES、(最終 pH 約 7.25)) に溶解し、1 ウェル当たり 25 μl 加える。Component A を添加してから約 1 時間後、FLIPR (Molecular Devices) または FDSS6000 (浜松ホトニクス社) を用いて膜電位変化の測定を行うことができる。測定プログラムは、当業者にとって適当な条件を設定でき、例えば、被検化合物添加前に 15 10 回、添加後に 50 回、6 秒毎とすることができる。測定は室温で行うことができる。hERG 阻害活性は、被検化合物添加により変化した蛍光強度から算出することができる。陽性対照として、E4031、Dofetillide 等を用いることができる。
- 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければ L 体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

cDNA : 相補的デオキシリボ核酸

25 A : アデニン

T : チミン

G : グアニン

C : シトシン  
 RNA : リボ核酸  
 mRNA : メッセンジャー・リボ核酸  
 G l y またはG : グリシン  
 5 A l a またはA : アラニン  
 V a l またはV : バリン  
 L e u またはL : ロイシン  
 I l e またはI : イソロイシン  
 S e r またはS : セリン  
 10 T h r またはT : スレオニン  
 C y s またはC : システイン  
 M e t またはM : メチオニン  
 G l u またはE : グルタミン酸  
 A s p またはD : アスパラギン酸  
 15 L y s またはK : リジン  
 A r g またはR : アルギニン  
 H i s またはH : ヒスチジン  
 P h e またはF : フェニルアラニン  
 T y r またはY : チロシン  
 20 T r p またはW : トリプトファン  
 P r o またはP : プロリン  
 A s n またはN : アスパラギン  
 G l n またはQ : グルタミン

25 本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号1] GenBank アクセッション番号 U04270 で表される塩基配列を示す。

[配列番号 2] GenBank アクセション番号 U04270 で表されるアミノ酸配列を示す。

[配列番号 3] hERG 遺伝子をクローニングするためのプライマー塩基配列を示す。

5 [配列番号 4] hERG 遺伝子をクローニングするためのプライマー塩基配列を示す。

[配列番号 5] hERG 遺伝子をクローニングするためのプライマー塩基配列を示す。

10 [配列番号 6] hERG 遺伝子をクローニングするためのプライマー塩基配列を示す。

[配列番号 7] hERG 遺伝子をクローニングするためのプライマー塩基配列を示す。

[配列番号 8] hERG 遺伝子をクローニングするためのプライマー塩基配列を示す。

15 [配列番号 9] multicloning site を挿入するための塩基配列を示す。

[配列番号 10] multicloning site を挿入するための塩基配列を示す。

[配列番号 11] central polypurine tract を挿入するための塩基配列を示す。

[配列番号 12] central polypurine tract を挿入するための塩基配列を示す。

[配列番号 13] pBabe Puro の塩基配列を示す。

20

### 実施例

以下に、具体的な例をもって本発明を示すが、本発明はこれに限られるものではない。

#### [実施例 1] hERG 遺伝子の調製

25 hERG 遺伝子の単離は、配列番号 1 で表される塩基配列を基にして、以下のように行った。ここでは 4070 bps が示されており、hERG チャネルをコードする領域(ストップコドンを除く) は、184-3660 (3477 bps, 1159 アミノ酸残基) とさ

れている (GenBank アクセッション番号 U04270)。PCR (polymerase chain reaction) により遺伝子を単離するために、配列番号 3 から 8 までに示す oligo DNA primer を作製した (日本バイオサービス(埼玉県朝霞市)に依頼)。

ヒト脳 polyA+ RNA (Clontech, Palo Alto, CA. catalog #6516-1)を鋳型として  
5 Superscript First-Strand Synthesis System (Invitrogen/Gibco, MD)により  
cDNA を作製した。次に、この cDNA 鋳型とし、配列番号 3 および 4、配列番号  
5 および 6 並びに配列番号 7 および 8 からなる oligo DNA をプライマーとして、  
Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)  
を用い、(95°C 30 秒-61°C 30 秒-68°C 1 分)を 30 回繰り返すことにより PCR 反  
応を行った。プライマーの塩基配列は以下の通りである。  
10

プライマー : AATTGGTACCATGGGCTCAGGATGCCGGTGC (配列番号 3)

プライマー : GCTTGTACTCAGGCAGCACGT (配列番号 4)

プライマー : CCACCAGTGACCGTGAGATCA (配列番号 5)

プライマー : TTGCAGTGCTGCAGCAGTGAG (配列番号 6)

15 プライマー : ATGCTAGCATCTCGGCAACG (配列番号 7)

プライマー : AATTAAGCTTTCGAGTCCTCTCCCCTTC (配列番号 8)

その結果、それぞれ約 1.2, 1.2, 1.6 kb の DNA 断片を得た。

これらの DNA 断片は、pT7Blue (Novagen, Darmstadt, Germany, catalog 69967-3)に挿入し、ABI prism DNA sequencing kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA)により配列を確認した。その結果、配列番号 3 および 4 からなるプライマーの組み合わせによって得られた 1179 bps の配列は、配列番号 1 における 173 bp から 1351 bp と同一であった。一方、配列番号 5 および 6 ならなるプライマーの組み合わせによって得られた 1168 bps の配列中には 2 つの変異(A1875G, T2149C)が見られたが、これらの変異は、該当部位の塩基配列から翻訳されるアミノ酸 (Leu, Tyr)には影響を与えないことが明らかである。  
25 また、配列番号 7 および 8 からなるプライマーの組み合わせによって得られた 1642 bps の配列中には 2 つの変異(C2420T, A3367G)が見られたが、今回得られ

た複数のクローンで同一の変異を有していたことから、今回使用している試料中（ヒト脳 polyA+ RNA (Clontech, Palo Alto, CA. catalog #6516-1)）の hERG 遺伝子として正しいと判断した。

pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA) を制限酵素 KpnI および XhoI で切断した。また、配列番号 3 および 4 からなるプライマーの組み合わせによって得られた DNA 断片を制限酵素 KpnI および BstEII で切断し、配列番号 5 および 6 からなるプライマーの組み合わせによって得られた DNA 断片を制限酵素 BstEII および XhoI で切断した。次に、ここで得られた DNA 断片を、制限酵素 KpnI および XhoI で切断された pBluescript 中へ、リガーゼ反応 (TaKaRa, Cat.6022) により挿入して pBS-1&14&15&18 を作製した。  
5

pBluescript を制限酵素 HindIII および XhoI で切断した。また、配列番号 7 および 8 からなるプライマーの組み合わせによって得られた DNA 断片を制限酵素 HindIII および SacI で切断した。次に、ここで得られた DNA 断片を、制限酵素 HindIII および XhoI で切断された pBluescript 中へ、リガーゼ反応により挿入し  
10

15 て pBS-6&4 を作製した。

さらに、pREP7 (Invitrogen, Carlsbad, CA.) を KpnI および HindIII で切断した。また、pBS-1&14&15&18 を KpnI および XhoI で、pBS-6&4 を XhoI および HindIII で切断した。次に、ここで得られた DNA 断片を KpnI および HindIII で切断された pREP7 中へリガーゼ反応により挿入して、hERG 遺伝子を含む  
20 pREP7HERG を得た。

## [実施例 2] レトロウイルスベクタープラスミドの調製

pBabe Puro (Morgenstern, J.P. and Land, H. Nucleic Acids Res. vol.18 3587-3596) (配列番号 1-3) から、制限酵素 SalI および ClaI で切断することにより SV40 promoter-puro(r)を除き、末端を Klenow fragment (Takara, Otsu, Japan) により平滑化した。ここへ pIRESpuro (Clontech, Palo Alto, CA. catalog #6031-1) から制限酵素 NsiI および XbaI で切断することにより IRES-puro(r)を

切り出し、T4 polymerase により末端を平滑化したものを探入し pBabeXIP を得た(図 1)。

pBabe Puro (Morgenstern, J.P. and Land, H. Nucleic Acids Res. vol.18 3587-3596) (配列番号 1 3) から SalI および ClaI で切断することにより SV40 promoter-puro(r)を除き、末端を Klenow fragment により平滑化した。ここへ pIREShyg (Clontech, Palo Alto, CA. catalog #6061-1)から NsiI および XbaI で切断することにより IRES-hyg(r)を切り出し、T4 polymerase により末端を平滑化したものを探入し pBabeXIHを得た(図 2)。

pBabeXIP から制限酵素 SspI および BamHI で切断することにより 5'-LTR-packaging signal を除いた。ここへ pCLXSN(IMGENEX San Diego, CA. catalog #10041P)から制限酵素 SspI および BamHI で切断することにより切り出した 5' LTR-CMV promoter-packaging signal を探入し pBabeCLXIPを得た(図 3)。

pBabeXIH から SspI および BamHI で切断することにより 5'-LTR-packaging signal を除いた。ここへ pCLXSN(IMGENEX San Diego, CA. catalog #10041P)から SspI および BamHI で切断することにより切り出した 5' LTR-CMV promoter-packaging signal を探入し pBabeCLXIHを得た(図 4)。

pBabeCLXIH から制限酵素 BglII で切断することにより IRES-hyg(r)を除き、末端を Klenow fragment により平滑化した。ここへ pIRES2-EGFP (Clontech, Palo Alto, CA. catalog #6029-1)から制限酵素 HincII で切断することにより IRES-EGFP を切り出したものを探入し pBabeCLXI2Gを得た(図 5)。

pBabeCLXIH から BglII で切断することにより IRES-hyg(r)を除き、末端を Klenow fragment により平滑化した。ここへ pIRES2-neo2 (Clontech, Palo Alto, CA. catalog #6938-1)から NsiI および XbaI で切断することにより IRES-neo(r)を切り出し、T4 polymerase により末端を平滑化したものを探入し pBabeCLXaINを得た(図 6)。

[実施例 3] hERG 遺伝子導入用レトロウイルスベクタープラスミドの調製

実施例 2 で得た pBabeCLXaIN を制限酵素 HpaI で切断した。ここへ実施例 1 で得た pREP7HERG から KpnI および HindIII で切断することにより hERG 遺伝子を切り出し、T4 polymerase により末端を平滑化したものを探入し 5 pBabeCL(hERG)aINを得た(図 7)。

実施例 2 で得た pBabeCLXIH を HpaI で切断した。ここへ実施例 1 で得た pREP7HERG から KpnI および HindIII で切断することにより hERG 遺伝子を切り出し、T4 polymerase により末端を平滑化したものを探入し pBabeCL(hERG)IHを得た(図 8)。

10 実施例 2 で得た pBabeCLXIP を HpaI で切断した。ここへ実施例 1 で得た pREP7HERG から KpnI および HindIII で切断することにより hERG 遺伝子を切り出し、T4 polymerase により末端を平滑化したものを探入し pBabeCL(hERG)IPを得た(図 9)。

15 実施例 2 で得た pBabeCLXI2G を HpaI で切断した。ここへ実施例 1 で得た pREP7HERG から KpnI および HindIII で切断することにより hERG 遺伝子を切り出し、T4 polymerase により末端を平滑化したものを探入し pBabeCL(hERG)I2Gを得た(図 10)。

20 実施例 2 で得た pBabeCLXIH を BglII で切断し、IRES-hyg(r)を除き、末端を Klenow fragment で平滑化した。ここへ実施例 1 で得た pREP7HERG から KpnI および HindIII で切断することにより hERG 遺伝子を切り出し、T4 polymerase により末端を平滑化したものを探入し pBabeCL(hERG)を得た(図 11)。

[実施例 4] レンチウイルスベクタープラスミドの調製

マルチクローニング部位(multicloning site)挿入のために配列番号：9 および 25 10 からなる oligo DNA を作製した(日本バイオサービス(埼玉県朝霞市)に依頼)。 oligo DNA の塩基配列を以下に示す。

oligo DNA :

GATCCCCCGGGCTGCAGGAATTGATATCGTTAACGTCGACCTCGAGGGT  
AC (配列番号 9)

oligo DNA :

CCTCGAGGTCTGACGTTAACGATATCGAATTCTGCAGCCGGGG (配列番号  
5 10)

配列番号 9 及び 10 の oligo DNA を、98°C、5 分間の熱変性後に緩やかに室温  
に戻すことでアニーリングさせた。

pLenti6/V5-GW/lacZ (Invitrogen, Carlsbad, CA. catalog K4955-10) から  
BamHI および KpnI で切断することにより lacZ-V5 epitope-SV40 early  
10 promoter-EM7 promoter-blasticidin(r)を除き、ここへ上記 oligo DNA を挿入し  
pLenti6/MCSを得た(図 1 2)。

central polypurine tract (cPPT)を導入し遺伝子導入能力を上昇させるために  
報告されている方法を参考にして、配列番号：11 および 12 に示す oligo DNA  
プライマーを作製した(Zennou, V.Z. et al. Cell vol.101 173-185 (2000)) (日本バ  
15 イオサービス(埼玉県朝霞市)に依頼)。

プライマー: GTCGTCAATCGATAAAATGGCAGTATTCCATCC (配列番号 11)

プライマー : GTCGTCAAGCTCCAAACTGGATCTCTGCTGTCC (配列番号  
12)

配列番号：11 および 12 からなる oligo DNA をプライマーとして、pLP1  
20 (ViraPower Lentiviral Gateway Expression kit, Invitrogen 社、K4960-00) プラ  
スミドを鋳型として、Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics,  
Mannheim, Germany)を用い、(95°C 30 秒-61°C 30 秒-68°C 1 分)を 30 回繰り返  
すことにより PCR 反応を行った。その結果、約 0.2kb の DNA 断片を得た。これ  
らの DNA 断片は、pT7Blue (Novagen, Darmstadt, Germany, catalog 69967-3)  
25 に挿入し、cPPT-pT7Blueを得た。この DNA 断片の塩基配列は、ABI prism DNA  
sequencing kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA)により配列  
が報告されている cPPT (Zennou, V.Z. et al. Cell vol.101 173-185 (2000))と同一

であることを確認した。

pBluescript (Staratagene)を制限酵素 ClaI および BamHI で切断し、ここへ cPPT を含む ClaI および HindIII で切断した cPPT-pT7Blue 並びに CMV promoter を含む BamHI および HindIII で切断した pLenti6/MCS を挿入し  
5 cPPT-CMV-pBSを得た。

pLenti6/MCSをClaI および BamHI で切断して CMV promoter を除き、ここへ cPPT-CMV promoter を含む ClaI および BamHI で切断した cPPT-CMV-pBS を挿入し pLenti6/cPPT-MCSを得た。pLenti6/ cPPT-MCSをKpnIで切断し、  
10 T4 polymerase により末端を平滑化した。ここへ pIRES2-EGFP (Clontech, catalog 6029-1)から HincII により IRES-EGFP 断片を切り出したものを挿入し pLenti6/cPPT-XI2Gを得た(図 1 3)。

#### [実施例 5] hERG 遺伝子導入用レンチウイルスベクタープラスミドの調製

実施例 4 で得た pLenti6/ cPPT-XI2G を EcoRI および SalI で切断した。ここ  
15 へ実施例 3 で得た pBabeCL(hERG)I2G から EcoRI および SalI により hERG 遺伝子を切り出し、T4 polymerase により末端を平滑化したもの挿入し pLenti6/cPPT-(hERG)I2Gを得た(図 1 4)。

#### [実施例 6] ベクタープラスミドの調製

実施例 1 で得た pREP7HERG から KpnI および HindIII で切断することによ  
り hERG 遺伝子を切り出し、KpnI および HindIII で開環した pZeoSV2  
20 (Invitrogen 社) に挿入し pZeoHERGを得た。

pZeoHERG を dam-大腸菌株 SCS110 に導入し、大量培養に続いてプラスミドを調製した後、当該プラスミドから得られた SV40 promoter-hERG 遺伝子  
25 (ClaI/fill-in-HindIII) を、pcDNA3.1 Neo から CMV promoter を除いた DNA 断片 (NurI-HindIII で開環した物) に導入し pSV hERG-Neo を作製した。発現ベクターを導入した大腸菌の大量培養は定法にて行い、ベクターの精製は、

EndoFree Plasmid Kit (Qiagen 社製) を用いて行った。

[実施例 7] hERG 遺伝子導入用レトロウイルスベクターの調製

2×10<sup>6</sup> の 293-EBNA 細胞(Invitrogen, catalog R620-07)を 10 cm コラーゲンコートディッシュ(IWAKI 東京 catalog4020-010)に DMEM (Sigma catalog D5796)-10% fetal bovine serum (FCS)-penicillin/streptomycin (PS) (以下、EBNA 培養液とする)10 ml を用いて培養した。翌日、pV-gp (pVPack-GP (Stratagene catalog#217566)から NsiI および XbaI で切断することにより IRES-hisD を除き T4polymerase による平滑化後、自己環化したもの)、pVPack-VSV-G (Stratagene, catalog#217567)、および実施例 3 で得た pBabeCL(hERG)I2G、それぞれ 3.3 μg をリポフェクション試薬である TransIT (Panvera, Madison, WI. catalog MIR2300)を用いてトランスフェクションした。その 6-12 時間後に EBNA 培養液を交換し、37°Cで培養を続けた。

トランスフェクション 2 日後に培養液を回収し、1,200 g で 10 分間遠心した。その上清を 0.45 μm のフィルター (Millipore, MILLEX-HV, catalog#SLHV025LS)でろ過したものを非濃縮レトロウイルスベクターとして以後の実験に供した。

[実施例 8] hERG 遺伝子導入用レンチウイルスベクターの調製

4×10<sup>6</sup> の 293-EBNA 細胞(Invitrogen, catalog R620-07)を 10 cm コラーゲンコートディッシュ(IWAKI 東京 catalog4020-010)に DMEM (Sigma catalog D5796)-10% fetal bovine serum (FCS)-penicillin/streptomycin (PS) (以下、EBNA 培養液とする)10 ml を用いて培養した。翌日、pLP1, pLP2, pLP/VSVG (いずれも Invitrogen, catalogK4970-10)、および実施例 5 で得たヒト hERG 遺伝子導入用レンチウイルスベクタープラスミド、それぞれ 2.5 μg をリポフェクション試薬である TransIT (Panvera, Madison, WI. catalog MIR2300)を用いてトランスフェクションした。その 6-12 時間後に EBNA 培養液を交換し、37°Cで培養を

続けた。

トランスフェクション 2 日後に培養液を回収し、1,200 g で 10 分間遠心した。その上清を 0.45  $\mu$  m のフィルター (Millipore, MILLEX-HV, catalog# SLHV025LS) でろ過したものをお濃縮レンチウイルスベクターとして以後の実験に供した。

#### [実施例 9] レトロウイルスベクターの濃縮

実施例 7 で調製したウイルスベクターの濃縮を以下のように行った。

超遠心用チューブ 50 Ultra-Clear Tubes (Beckman, Palo Alto, CA. catalog344058) を 70% エタノールで消毒後に蒸留水ですすぎ、ここへ非濃縮ウイルスベクター約 35 ml を入れた。これを超遠心ローター SW28 (Beckman) に入れ、超遠心装置 XL-90 (Beckman) を使って 19,500 rpm 100 分間の遠心操作を行った。遠心後、上清を捨てたチューブを氷に入れて放置した。一時間後、チューブ壁面に残った培養液約 100  $\mu$  l 程度の濃縮ウイルスベクター溶液が得られた。必要に応じて、濃縮ウイルスベクター溶液を集め再度超遠心操作を行って再濃縮ウイルスベクター溶液を調製した。

#### [実施例 10] レンチウイルスベクターの濃縮

実施例 8 で調製したウイルスベクターの濃縮を以下のように行った。超遠心用チューブ 50 Ultra-Clear Tubes (Beckman, Palo Alto, CA. catalog344058) を 70% エタノールで消毒後に蒸留水ですすぎ、ここへ非濃縮ウイルスベクター約 35 ml を入れた。これを超遠心ローター SW28 (Beckman) に入れ、超遠心装置 XL-90 (Beckman) を使って 19,500 rpm 100 分間の遠心操作を行った。遠心後、上清を捨てたチューブを氷に入れて放置した。一時間後、チューブ壁面に残った培養液約 100  $\mu$  l 程度の濃縮ウイルスベクター溶液が得られた。必要に応じて、濃縮ウイルスベクター溶液を集め再度超遠心操作を行って再濃縮ウイルスベクター溶液を調製した。

[実施例 11] hERG 遺伝子導入用レトロウイルスベクターによる hERG 発現細胞の調製

実施例 7 で調製したウイルスベクターによる細胞への hERG 遺伝子導入を以下のように行った。

3×10<sup>3</sup> の Chinese Hamster Ovary (CHO)-K1 細胞(理化学研究所ジーンバンク細胞開発銀行)を 96 well plate (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ. catalog35-3075)に DMEM/F12 (Invitrogen corp. catalog11320-033)-10% fetal bovine serum (FCS)-penicillin/streptomycin (PS) (以下、CHO 培養液とする)100 μl を用いて培養した。翌日、実施例 7 で調製したウイルスベクター100 μl を、培養液で調製した polybrene (最終濃度 8 μg/ml) (Sigma H9268 別名 hexadimethrine bromide)とともに CHO 細胞に加えた。その翌日、ウイルスベクターを含む培養液を CHO 培養液 200 μl と交換し、さらに、3 日間培養した。ここで得られた hERG 遺伝子導入細胞は、細胞集団としておおよその性質を知るために以下の実験に供すると共に、必要に応じて実施例 18 に示す細胞クローニングを行って以下の実験に供した。

[実施例 12] hERG 遺伝子導入用レンチウイルスベクターによる hERG 発現細胞の調製

実施例 8 で調製したウイルスベクターによる細胞への hERG 遺伝子導入を以下のように行った。

3×10<sup>3</sup> の Chinese Hamster Ovary (CHO)-K1 細胞(理化学研究所ジーンバンク細胞開発銀行)を 96 well plate (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ. catalog35-3075)に DMEM/F12 (Invitrogen corp. catalog11320-033)-10% fetal bovine serum (FCS)-penicillin/streptomycin (PS) (以下、CHO 培養液とする)100 μl を用いて培養した。翌日、実施例 8 で調製したウイルスベクター100 μl を、培養液で調製した polybrene (最終濃度 8 μg/ml) (Sigma H9268 別名

hexadimethrine bromide)とともに CHO 細胞に加えた。その翌日、ウイルスベクターを含む培養液を CHO 培養液 200  $\mu$ l と交換し、さらに、3 日間培養した。ここで得られた hERG 遺伝子導入細胞は、細胞集団としておおよその性質を知るために以下の実験に供すると共に、必要に応じて実施例 1 7、および実施例 1 8 5 に示す細胞クローニングを行って以下の実験に供した。

[実施例 1 3] hERG 遺伝子導入用レトロウイルスベクターによる hERG 発現細胞の調製－2

実施例 9 で遠心濃縮したウイルスベクターによる細胞への hERG 遺伝子導入 10 を以下のように行った。

$3 \times 10^3$  の Chinese Hamster Ovary (CHO)-K1 細胞(理化学研究所ジーンバンク細胞開発銀行)を 96 well plate (Becton·Dickinson, Franklin Lakes, NJ. catalog35-3075)に DMEM/F12 (Invitrogen corp. catalog11320-033)-10% fetal bovine serum (FCS)-penicillin/streptomycin (PS) (以下、CHO 培養液とする)100 15  $\mu$ l を用いて培養した。翌日、実施例 9 で遠心濃縮したウイルスベクター 100  $\mu$ l を、培養液で調製した polybrene (最終濃度 8  $\mu$ g/ml) (Sigma H9268 別名 hexadimethrine bromide)とともに CHO 細胞に加えた。その翌日、ウイルスベクターを含む培養液を CHO 培養液 200  $\mu$ l と交換し、さらに、3 日間培養した。ここで得られた hERG 遺伝子導入細胞は、細胞集団としておおよその性質を知る 20 ために以下の実験に供すると共に、必要に応じて実施例 1 8 に示す細胞クローニングを行って以下の実験に供した。

[実施例 1 4] hERG 遺伝子導入用レトロウイルスベクターによる hERG 発現細胞の調製－3

実施例 1 8 に示す細胞クローニングを行い、適切な hERG 電流が記録できた細胞株に対して、実施例 9 で遠心濃縮したウイルスベクターによる細胞への hERG 遺伝子導入を以下のように行った。

実施例 1.3 で得られた hERG 発現細胞株 ( $3 \times 10^3$ ) を 96 well plate (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ. catalog35-3075) に DMEM/F12 (Invitrogen corp. catalog11320-033)-10% fetal bovine serum (FCS)-penicillin/streptomycin (PS) (以下、CHO 培養液とする)  $100 \mu l$  を用いて 5 培養した。翌日、実施例 9 で遠心濃縮したウイルスベクター  $100 \mu l$  を最終濃度  $8 \mu g/ml$  となるように、培養液で調製した polybrene (最終濃度  $8 \mu g/ml$ ) (Sigma H9268 別名 hexadimethrine bromide)とともに CHO 細胞に加えた。その翌日、ウイルスベクターを含む培養液を CHO 培養液  $200 \mu l$  と交換し、さらに、3 日間 10 培養した。ここで得られた hERG 遺伝子導入細胞は、細胞集団としておおよその性質を知るために以下の実験に供すると共に、必要に応じて実施例 1.8 に示す細胞クローニングを行って以下の実験に供した。

[実施例 1.5] hERG 遺伝子導入用 レンチウイルスベクターによる hERG 発現細胞の調製－2

15 実施例 1.0 で調製したウイルスベクターによる細胞への hERG 遺伝子導入を以下のように行った。

$3 \times 10^3$  の Chinese Hamster Ovary (CHO)-K1 細胞(理化学研究所ジーンバンク細胞開発銀行)を 96 well plate (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ. catalog35-3075) に DMEM/F12 (Invitrogen corp. catalog11320-033)-10% fetal bovine serum (FCS)-penicillin/streptomycin (PS) (以下、CHO 培養液とする)  $100 \mu l$  を用いて培養した。翌日、実施例 1.0 で遠心濃縮したウイルスベクター  $100 \mu l$  を、培養液で調製した polybrene (最終濃度  $8 \mu g/ml$ ) (Sigma H9268 別名 hexadimethrine bromide)とともに CHO 細胞に加えた。その翌日、ウイルスベクターを含む培養液を CHO 培養液  $200 \mu l$  と交換し、さらに、3 日間培養した。20 ここで得られた hERG 遺伝子導入細胞は、細胞集団としておおよその性質を知るために以下の実験に供すると共に、必要に応じて実施例 1.7 および実施例 1.8 に示す細胞クローニングを行って以下の実験に供した。

[実施例 1 6] リポフェクション法を用いた hERG 遺伝子導入用ベクターによる hERG 発現細胞の調製

CHO-K1 細胞(理研ジーンバンク・細胞開発銀行)への hERG 遺伝子導入用ベクターの導入を Effectene Transfection Reagent Handbook に従って以下のように行つた。

直径 6cm 培養シャーレに 2 日間培養した CHO-K1 細胞に、TE 液に溶解した約 1 $\mu$ g の hERG 発現ベクター (SV-hERG-neo) と 8 $\mu$ L の Enhancer を最終容量 150 $\mu$ L になるように混和し、約 1 秒間攪拌した後、室温で 2-5 分間静置した。次に、Effectene Transfection Reagent を 25 $\mu$ L 加え約 10 秒間攪拌した後、室温で 5-10 分間静置し、培地を 1mL 加えた。この溶液を、細胞を PBS(-)で洗浄し、4mL の培地を加えた培養シャーレに添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。翌日、トリプシンにて細胞を培養シャーレから剥がし、500 $\mu$ g 力価の G418 を含む培地に懸濁した。数日間培養した後、実施例 1 8 に示す細胞クローニングを行つて以下の実験に供した。

[実施例 1 7] GFP 発現を指標とした FACS による hERG 高発現細胞の分離濃縮

実施例 1 2 または実施例 1 5 で調製した hERG 導入細胞の中から GFP 発現を指標とし FACS Aria(Becton Dickinson 社)を用いて、より高発現の細胞を分離濃縮した。10cm dish に調製した細胞を trypsin で剥がし、FACS Aria の使用法に従つて GFP が高発現している細胞のみを分離した。分離後の細胞を解析したところ GFP 高発現の細胞が濃縮されていることが示された。得られた細胞は実施例 1 8 に示す細胞クローニングを行つて以下の実験に供した。

[実施例 1 8] hERG チャネル発現細胞のクローニング

細胞のクローニングは限外希釈法にて行つた。96 well 培養プレートの 1 well

あたり 0.3 個の細胞になるように細胞懸濁液を調整し、各 well に 200  $\mu$ L ずつ分注した。約 2 週間後、顕微鏡観察下で、1 つの well に 1 つの細胞集団（コロニー）が観察された well の細胞を 24 well 培養プレートに移し継続して培養した。また、その後 F75 培養フラスコまで規模を拡張し、ウェスタンプロット法によるタンパク発現の確認と電気生理学的手法による hERG チャネルの機能的発現により hERG チャネル発現細胞株を選別した（実施例 19 および 20）。

#### [実施例 19] ウェスタンプロット法による hERG チャネルの検出

本試験は、CHO-K1 細胞、リポフェクション法で hERG 遺伝子を導入した細胞株（実施例 16）およびレトロウイルスで hERG 遺伝子を導入した細胞株（実施例 14）を用いて行った。6 穴プレートにて培養したそれぞれの細胞を、氷冷 PBS にて洗浄し、Protease Inhibitor Cocktail (SIGMA-Aldrich Co.) を添加した Lysis Buffer (150 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、5 mmol/L EDTA、0.5% Nonidet P-40、0.5% Deoxycholic Acid Sodium) を加え、セルスクレイパーで剥がした。剥がした細胞をエッペンドルフチューブに回収し、4°C にて 10,000 rpm (遠心機 : MRX-152、ローター : TMA-6、トミー精工) で 3 分間遠心した後、上清をサンプルとして回収した。サンプルのタンパク質濃度は、BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA) を用いて測定した。

タンパク質の電気泳動、転写には NOVEX (Invitrogen) の装置を使用した。  
回収したサンプルに、NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen) および NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen) を適量加え、95°C にて 3 分間加熱した。NuPAGE 3-8% Tris-Acetate Gel (Invitrogen) にサンプルをアプライし、NuPAGE Tris-Acetate Running Buffer (Invitrogen) を用いて 120 V で約一時間電気泳動を行った。電気泳動を終えたゲルを、Immun-Blot PVDF Membrane (Bio-Rad Laboratories, Inc.) とともに Xcell Surelock™ (Invitrogen) にセットし、NuPAGE Transfer Buffer (Invitrogen) を用いて 30 V で約一時間、転写を行った。

一次抗体には Anti-HERG (Alomone Labs) を、二次抗体には Anti Rabbit IgG HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology、 Inc.) を用いた。一次抗体反応後と二次抗体反応後には、0.1 % Tween20/PBS にて PVDF Membrane の洗浄を行った。結合抗体の検出には、ECL detection kit (Amersham Biosciences Corp.) を用いた。

その結果、normal CHO-K1 細胞には hERG タンパクに相当する分子量約 150kD のバンドは全く検出されなかった（図 15、レーン 1）。また、リポフェクション法で hERG 遺伝子を導入し樹立した細胞株 M3 細胞には、わずかに hERG タンパクのバンドが検出された（図 15、レーン 2）。それに対して、レトロウイルスで hERG 遺伝子を導入した細胞株には明らかに多量の hERG タンパクが検出された（図 15、レーン 3）。

#### [実施例 20] 全自動ハイスループットパッチクランプシステムによる hERG 電流の測定および電流分布比較

リポフェクション法で hERG 遺伝子を導入した細胞株（実施例 16）およびレトロウイルスで hERG 遺伝子を導入した細胞（実施例 13）および細胞株（実施例 14）を用いて行った。hERG チャネル発現細胞を F75 培養フラスコで培養した。培養した後、EDTA を含む PBS(-) 溶液を用いて F75 培養フラスコから剥がし、適当な濃度（ $1.0 \sim 1.5 \times 10^6$  cell/ml）になるように細胞を PBS 溶液に懸濁した。その細胞懸濁液を IonWorks HT™ システムの細胞用リザーバーに移した。  
hERG 電流測定の手順としては、測定用プレート（PatchPlate™、Molecular Devices Corp.）の各ウェルに PBS を分注し、次に細胞浮遊液を分注し、ウェルの中央にある穴に細胞がシールを形成するまで放置した。シール形成後、アンフオテリシン B を含む溶液（KCl 140mM、MgCl<sub>2</sub> 1mM、EGTA 1mM、HEPES 20mM、pH 7.25-7.3）を灌流し、穿孔パッチを形成させた。穿孔パッチ形成後、刺激電極を介した膜電位固定法により細胞に電位変化を与え、hERG 電流を誘発させ、hERG 電流を記録した。

hERG 電流は、電位を-80mV から+20mV ～ 1 秒間、続いて-50mV ～ 1 秒間変化させ誘発させた。hERG 電流の大きさは、-50mV に電位を戻した際に観察される末尾電流のピーク値を用いた。リポフェクション法で hERG 遺伝子を導入した細胞株およびレトロウイルスで hERG 遺伝子を導入した細胞株から記録された  
5 hERG 電流の分布を図 1 6 および表 1 に示す。

リポフェクション法で hERG 遺伝子を導入し樹立した細胞株（実施例 1 6）の  
hERG 電流分布（表 1、図 1 6 の A）よりも、レトロウイルスを用いて hERG 遺  
伝子を導入し樹立した細胞（実施例 1 3）の電流分布は大きく（表 1、図 1 6 の  
B）、また細胞株（実施例 1 4）の電流分布は明らかに大きかった（表 1、図 1 6  
10 の C）。

表 1

A

| Amplitude (nA) | 0-0.2 | 0.2-0.4 | 0.4-0.6 | 0.6-0.8 | 0.8-1.0 | 1.0-1.2 | 1.2-1.4 | 1.4-1.6 | 1.6-1.8 | 1.8-2.0 | 2.0-2.2 | 2.2-2.4 | > 2.4 | SUM   |
|----------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|-------|
| number         | 240   | 21      | 1       | 1       | 0       | 1       | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | 0     | 264   |
| ratio (%)      | 90.9  | 8.0     | 0.4     | 0.4     | 0.0     | 0.4     | 0.0     | 0.0     | 0.0     | 0.0     | 0.0     | 0.0     | 0.0   | 100.0 |

B

| Amplitude (nA) | 0-0.2 | 0.2-0.4 | 0.4-0.6 | 0.6-0.8 | 0.8-1.0 | 1.0-1.2 | 1.2-1.4 | 1.4-1.6 | 1.6-1.8 | 1.8-2.0 | 2.0-2.2 | 2.2-2.4 | > 2.4 | SUM   |
|----------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|-------|
| number         | 12    | 61      | 66      | 48      | 28      | 15      | 16      | 9       | 6       | 5       | 1       | 0       | 1     | 268   |
| ratio (%)      | 4.5   | 22.8    | 24.6    | 17.9    | 10.4    | 5.6     | 6.0     | 3.4     | 2.2     | 1.9     | 0.4     | 0.0     | 0.4   | 100.0 |

C

| Amplitude (nA) | 0-0.2 | 0.2-0.4 | 0.4-0.6 | 0.6-0.8 | 0.8-1.0 | 1.0-1.2 | 1.2-1.4 | 1.4-1.6 | 1.6-1.8 | 1.8-2.0 | 2.0-2.2 | 2.2-2.4 | > 2.4 | SUM   |
|----------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|-------|
| number         | 17    | 19      | 27      | 34      | 53      | 48      | 45      | 26      | 25      | 16      | 7       | 6       | 5     | 328   |
| ratio (%)      | 5.2   | 5.8     | 8.2     | 10.4    | 16.2    | 14.6    | 13.7    | 7.8     | 7.6     | 4.9     | 2.1     | 1.8     | 1.5   | 100.0 |

表 1 において、A は、リポフェクション法により hERG 遺伝子を導入した細胞  
15 株、B はレトロウイルスにより hERG 遺伝子を導入した細胞、C はレトロウイル  
スにより hERG 遺伝子を導入した細胞株の hERG 電流分布を表わす。

さらに、化合物の hERG 電流阻害活性を、より安定的に評価するためにカット  
オフ値を設定し、各 hERG 発現細胞の hERG 電流について解析した。カットオ  
フ値としては、1) +20mV に脱分極したときの電流値に対する末尾電流のピ  
20 ク値の比が 0.8 未満、2) シール抵抗が 30MΩ 未満の 2 項目を設定し、それらの  
条件を満たすデータについて解析した。

カットオフ値を設定し、解析した結果を図17および表2に示す。

リポフェクション法でhERG遺伝子を導入し樹立した細胞株（実施例16）のhERG電流分布（表2、図17のA）よりも、レトロウイルスを用いてhERG遺伝子を導入し樹立した細胞（実施例13）の電流分布は大きく（表2、図17のB）、また細胞株（実施例14）の電流分布は明らかに大きかった（表2、図17のC）。さらに、一年間継続培養した細胞の電流は安定していた（表2、図17のD）。また、レンチウイルスを用いてhERG遺伝子を導入し樹立した細胞株（実施例18）の電流分布もレトロウイルスを用いて樹立した細胞株と同様に明らかに大きく、このことは一年間継続培養してもhERGチャネルが安定して発現していることを意味していた（表2、図17のE）。

表2

A

| Amplitude(nA) | 0-0.2 | 0.2-0.4 | 0.4-0.6 | 0.6-0.8 | 0.8-1.0 | 1.0-1.2 | 1.2-1.4 | 1.4-1.6 | 1.6-1.8 | 1.8-2.0 | 2.0-2.2 | 2.2-2.4 | >2.4 | SUM   |
|---------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------|-------|
| number        | 8     | 19      | 1       | 0       | 0       | 1       | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | 0    | 29    |
| ratio (%)     | 27.6  | 65.5    | 3.4     | 0.0     | 0.0     | 3.4     | 0.0     | 0.0     | 0.0     | 0.0     | 0.0     | 0.0     | 0.0  | 100.0 |

B

| Amplitude (nA) | 0-0.2 | 0.2-0.4 | 0.4-0.6 | 0.6-0.8 | 0.8-1.0 | 1.0-1.2 | 1.2-1.4 | 1.4-1.6 | 1.6-1.8 | 1.8-2.0 | 2.0-2.2 | 2.2-2.4 | >2.4 | SUM   |
|----------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------|-------|
| number         | 11    | 60      | 65      | 46      | 28      | 15      | 16      | 9       | 7       | 4       | 1       | 0       | 1    | 263   |
| ratio (%)      | 4.2   | 22.8    | 24.7    | 17.5    | 10.6    | 5.7     | 6.1     | 3.4     | 2.7     | 1.5     | 0.4     | 0.0     | 0.4  | 100.0 |

C

| Amplitude(nA) | 0-0.2 | 0.2-0.4 | 0.4-0.6 | 0.6-0.8 | 0.8-1.0 | 1.0-1.2 | 1.2-1.4 | 1.4-1.6 | 1.6-1.8 | 1.8-2.0 | 2.0-2.2 | 2.2-2.4 | >2.4 | SUM   |
|---------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------|-------|
| number        | 1     | 14      | 38      | 62      | 59      | 39      | 33      | 20      | 18      | 8       | 5       | 2       | 3    | 302   |
| ratio (%)     | 0.3   | 4.6     | 12.6    | 20.5    | 19.5    | 12.9    | 10.9    | 6.6     | 6.0     | 2.6     | 1.7     | 0.7     | 1.0  | 100.0 |

D

|           | 0-0.2 | 0.2-0.4 | 0.4-0.6 | 0.6-0.8 | 0.8-1.0 | 1.0-1.2 | 1.2-1.4 | 1.4-1.6 | 1.6-1.8 | 1.8-2.0 | 2.0-2.2 | 2.2-2.4 | >2.4 | SUM   |
|-----------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------|-------|
| number    | 2     | 32      | 55      | 81      | 66      | 37      | 18      | 20      | 17      | 4       | 3       | 3       | 5    | 343   |
| ratio (%) | 0.6   | 9.3     | 16.0    | 23.6    | 19.2    | 10.8    | 5.2     | 5.8     | 5.0     | 1.2     | 0.9     | 0.9     | 1.5  | 100.0 |

E

| Amplitude(nA) | 0-0.2 | 0.2-0.4 | 0.4-0.6 | 0.6-0.8 | 0.8-1.0 | 1.0-1.2 | 1.2-1.4 | 1.4-1.6 | 1.6-1.8 | 1.8-2.0 | 2.0-2.2 | 2.2-2.4 | >2.4 | SUM   |
|---------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------|-------|
| number        | 0     | 18      | 55      | 67      | 49      | 36      | 19      | 7       | 13      | 2       | 1       | 3       | 0    | 271   |
| ratio (%)     | 0.0   | 7.0     | 20.3    | 24.7    | 18.1    | 13.3    | 7.0     | 2.6     | 4.8     | 0.7     | 0.4     | 1.1     | 0.0  | 100.0 |

15 表2において、Aは、リポフェクション法によりhERG遺伝子を導入した細胞株、BはレトロウイルスによりhERG遺伝子を導入した細胞、CはレトロウイルスによりhERG遺伝子を導入した細胞株、DはレトロウイルスによりhERG遺

伝子を導入した細胞株を一年間継続培養した細胞株、E はレンチウイルスにより hERG 遺伝子を導入した細胞株の hERG 電流分布を表わす。

5 [実施例 21] 全自動ハイスループットパッチクランプシステムによる被検化合物の hERG チャネル阻害活性の評価

リポフェクション法で hERG 遺伝子を導入した細胞株（実施例 16）およびレトロウイルスで hERG 遺伝子を導入した細胞株（実施例 14）を用いて行った。hERG 電流の測定は実施例 20 と同様に行った。また、被検化合物または既知化合物の hERG チャネルに対する阻害活性は、被検化合物添加前に記録された末尾電流のピーク値を 100%としたときの、各濃度の被検物質を添加した後の末尾電流のピーク値の割合から抑制率を算出した。被検化合物のそれぞれの濃度における抑制率より hERG 電流に対する阻害活性値（IC<sub>50</sub> 値）を算出した。

各薬剤の評価濃度は、アステミゾール、E-4031、リスペリドン、ベラパミルが 0.016, 0.048, 0.014, 0.041, 0.123, 0.37, 1.11, 3.33 μM、キニジンは 0.048, 0.014, 15 0.041, 0.123, 0.37, 1.11, 3.33, 10 μM とした。また、薬剤は約 4 分間作用させた。

その結果、リポフェクション法で hERG 遺伝子を導入した細胞株では、殆どのデータポイントが欠落していたが、レトロウイルスで hERG 遺伝子を導入した細胞株では、全てのデータを取得でき、各薬剤の IC<sub>50</sub> 値（0.083、0.044、0.536、0.720、0.385 μM）も求めることが出来た（図 18）。

20 [実施例 22] FLIPR Membrane Potential Assay Kit を用いた膜電位変化の測定

レトロウイルスで hERG 遺伝子を導入した細胞株（実施例 14）を用いて行った。また、FLIPR Membrane Potential Assay Kit (Molecular Devices)、25 FDSS6000 (浜松ホトニクス社) を用いた。hERG チャネル発現細胞を、測定二日前に Biocoat Poly-D-Lysine 384-Well Black/Clear Plate (BECKTON DICKINSON) に蒔いた。細胞溶液は  $1.2 \times 10^5$  cells/ml の濃度に調製し、1 ウェ

ル当たり  $25 \mu\text{l}$  とした。FLIPR Membrane Potential Assay Kit の Component A を測定用緩衝液 (130mM NaCl、5mM KCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、1mM CaCl<sub>2</sub>、24mM Glucose、10mM HEPES、(最終 pH 約 7.25)) に溶解し、1 ウェル当たり  $25 \mu\text{l}$  加えた。ComponentA を添加してから約 1 時間後、FDSS6000 を用いて膜電位変化の測定を行った。測定プログラムは、被検物質添加前に 10 回、添加後に 50 回、6 秒毎とした。測定は室温で行った。hERG 阻害活性は、被検物質添加後 5 分間で変化した蛍光強度から算出した。陽性対照として、E4031、Dofetillide を用いた。

結果を図 19 に示す。KCl 添加によって、膜電位が脱分極したことを意味する蛍光強度の変化が観察された。また、hERG 阻害剤である E4031 および Dofetillide によっても同様の膜電位変化が見られ、その変化は濃度依存的であった。

#### [実施例 23] 古典的パッチクランプ法による hERG 電流の記録

古典的パッチクランプ法による hERG 電流の記録は、本発明の hERG 発現細胞を用いて行った。また、hERG 電流の測定を論文 [Zhou, Z et al, Biophysical Journal, 74, 230-241 (1998)] を参考に以下のように行った。

ポリリジンをコーティングしたガラスプレート上に細胞を蒔き、2~4 日間培養した。実験時に細胞を蒔いたガラスプレートを電流測定用バスに移動した。hERG 電流は、ホールセルパッチクランプ法の膜電位固定法にて観察した。hERG 電流の記録用の溶液としては、細胞外灌流溶液 (NaCl 137 mM、KCl 4 mM、MgCl<sub>2</sub> 1 mM、CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM、glucose 10 mM、HEPES 10 mM pH7.4) および電極内溶液 (KCl 130 mM、MgCl<sub>2</sub> 1 mM、Mg-ATP 5 mM、EGTA 5 mM、HEPES 10 mM、pH7.2) を用いた。hERG 電流の測定には電流増幅装置(Axon Instruments)を用い、電流の記録および解析には pCLAMP ソフトウェア(Axon Instruments)を使用した。hERG 電流は、電位を -80mV から +20mV へ 5 秒間、そして -50mV へ 4 秒間変化させ、この電位変化を 20 秒間隔で細胞に与え誘発した。また、hERG

電流の大きさには、-50mV に電位を戻した際に観察される末尾電流のピーク値を用いた。

### 産業上の利用可能性

5 本発明により、薬剤研究開発での hERG チャネル阻害に基づく副作用を予測するための発現レベルの著しく高い hERG チャネル発現細胞の樹立法を確立し、それにより高感度で処理能力の高い評価を可能とした。

本発明により、同時に効率よく hERG チャネルの高発現細胞を得られることを利用して、多様な細胞種に対して hERG 遺伝子を高レベルで発現させることにより、各細胞種間で内在性のイオンチャンネルの影響を比較することで、薬剤研究開発における副作用予測を行う上で最も適切な細胞種を選択することを可能としている。また、本発明の hERG チャネル発現細胞または hERG チャネル発現細胞集団は、長期間安定的に hERG チャネルを発現することができる。

### 15 配列表フリーテキスト

配列番号 3 : プライマー

配列番号 4 : プライマー

配列番号 5 : プライマー

配列番号 6 : プライマー

20 配列番号 7 : プライマー

配列番号 8 : プライマー

配列番号 9 : oligo DNA

配列番号 10 : oligo DNA

配列番号 11 : プライマー

25 配列番号 12 : プライマー

本明細書において引用した刊行物は、全体を通して本明細書に組み込むものと

する。

## 請求の範囲

1. 全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法により測定される hERG 電流が 0. 6 nA 以上のチャネルを発現することができる細胞を、hERG 遺伝子が導入された細胞全体の 40 %以上含む、hERG チャネル発現細胞集団。  
5
2. hERG 遺伝子の導入がウイルスベクターによるものである請求項 1 記載の細胞集団。
3. ウイルスベクターがレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター 10 である請求項 2 記載の細胞集団。
4. hERG 電流の細胞全体の平均が 0. 3 nA 以上である請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の細胞集団。
5. 全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いたパッチクランプ法 15 により測定される hERG 電流が 1. 0 nA 以上の hERG チャネルを発現することができる細胞。
6. hERG 遺伝子の導入がウイルスベクターによるものである請求項 5 記載の細胞。
7. ウイルスベクターがレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター 20 である請求項 6 記載の細胞。
8. ウイルスベクターを用いて hERG チャネルを発現させることを特徴とする、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の細胞集団または請求項 5 から 7 のいずれか 1 項に記載の細胞を作製する方法。
9. ウイルスベクターがレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター 25 である請求項 8 記載の方法。
10. ウイルスベクターがレトロウイルスベクターである請求項 8 記載の方法。
11. ウイルスベクターを超遠心により濃縮する工程を含むことを特徴とする、請求項 8 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

- 1 2. 請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の細胞集団または請求項 5 から 7 の  
5 いずれか 1 項に記載の細胞を用いることを特徴とする、hERG 電流の阻害活性を測定する方法。
- 1 3. 全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いることを特徴とする  
10 請求項 1 2 記載の方法。
- 1 4. 請求項 8 から 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法により作製された細胞集団  
15 または細胞を用いることを特徴とする、hERG 電流の阻害活性を測定する方法。
- 1 5. 全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いることを特徴とする  
20 請求項 1 4 記載の方法。
- 1 6. 請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の細胞集団または請求項 5 から 7 の  
15 いずれか 1 項に記載の細胞を用いることを特徴とする、hERG 電流を変化させ、もしくは変化させない化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 1 7. 全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いることを特徴とする  
25 請求項 1 6 記載の方法。
- 1 8. 請求項 8 から 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法により作製された細胞集団  
30 または細胞を用いることを特徴とする、hERG 電流を変化させ、もしくは変化させない化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 1 9. 全自動ハイスループットパッチクランプシステムを用いることを特徴とする  
35 請求項 1 8 記載の方法。

図 1

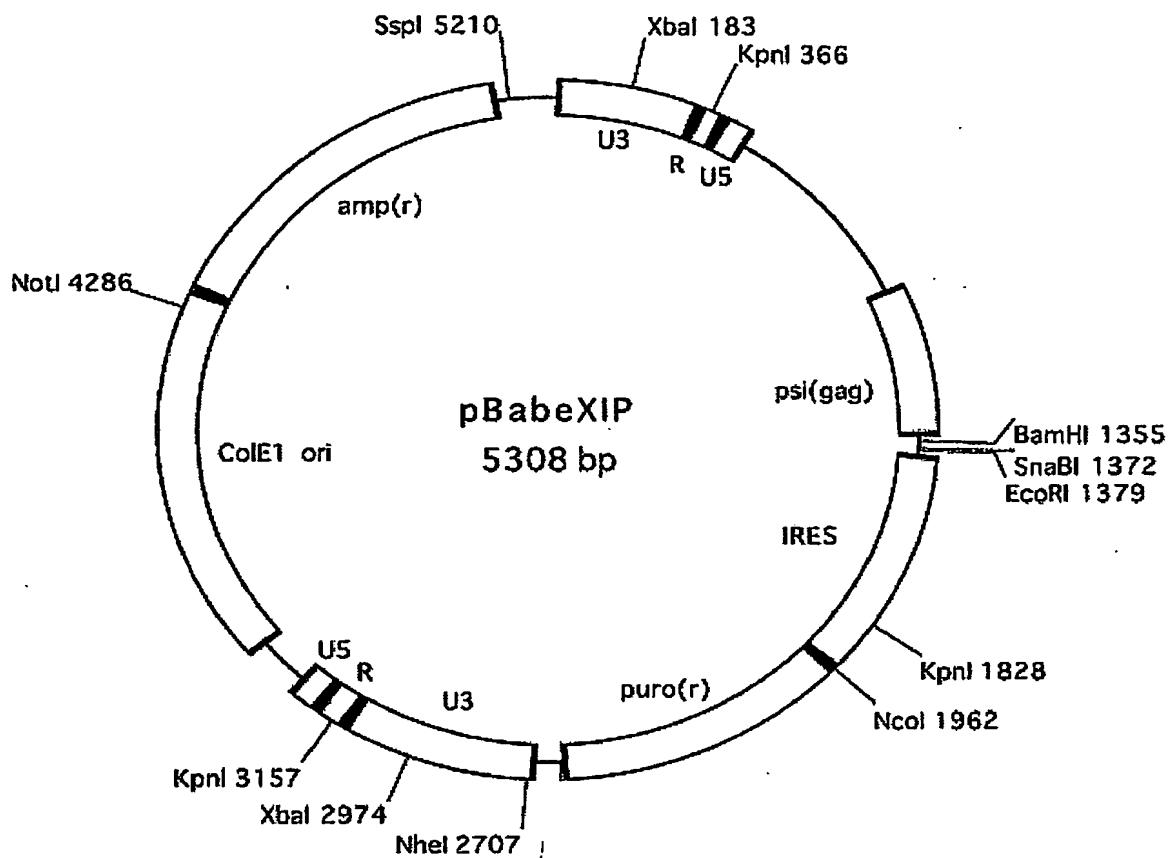


図 2

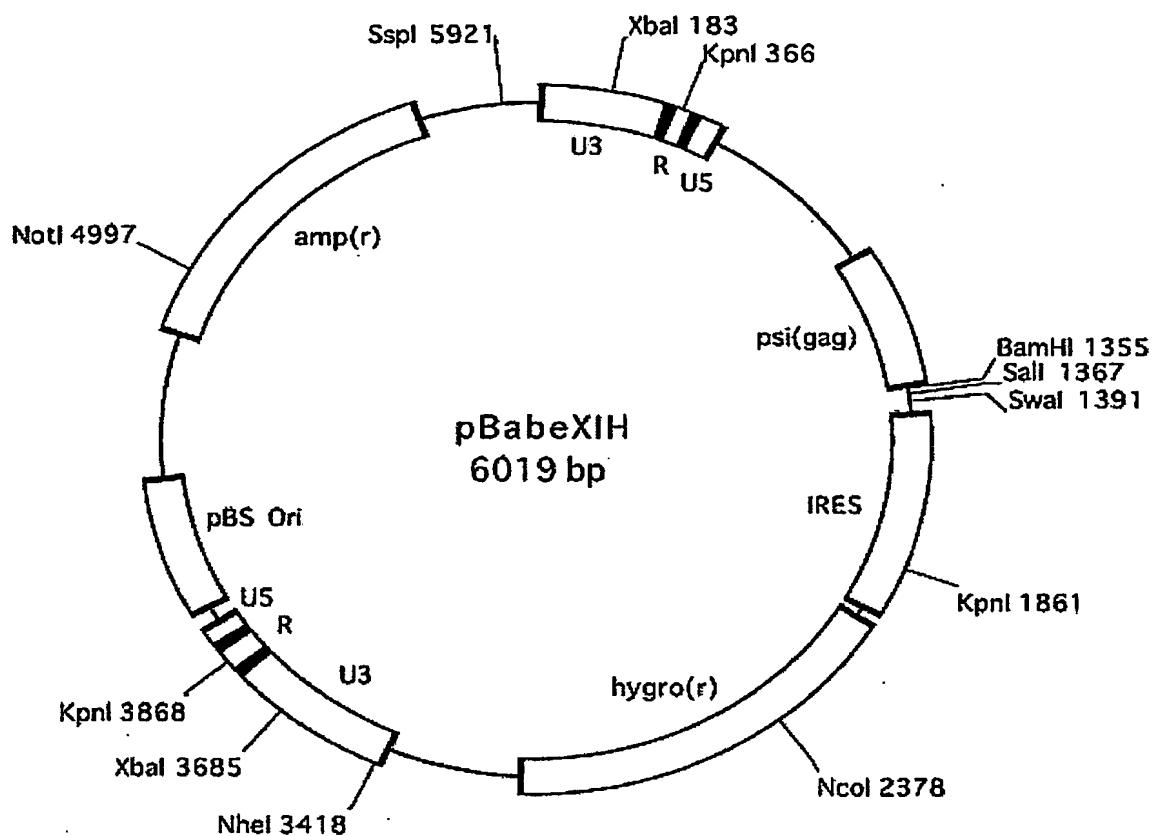


図 3

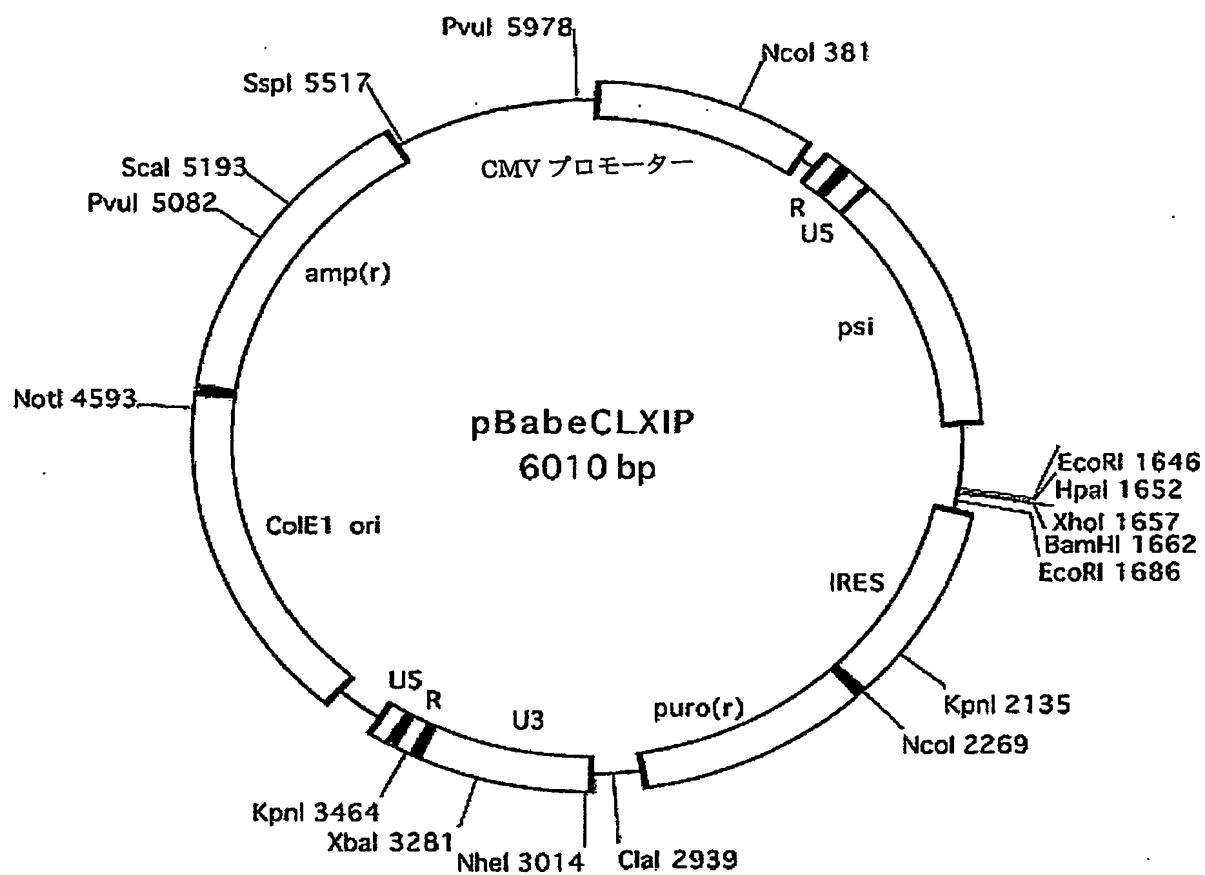


図4

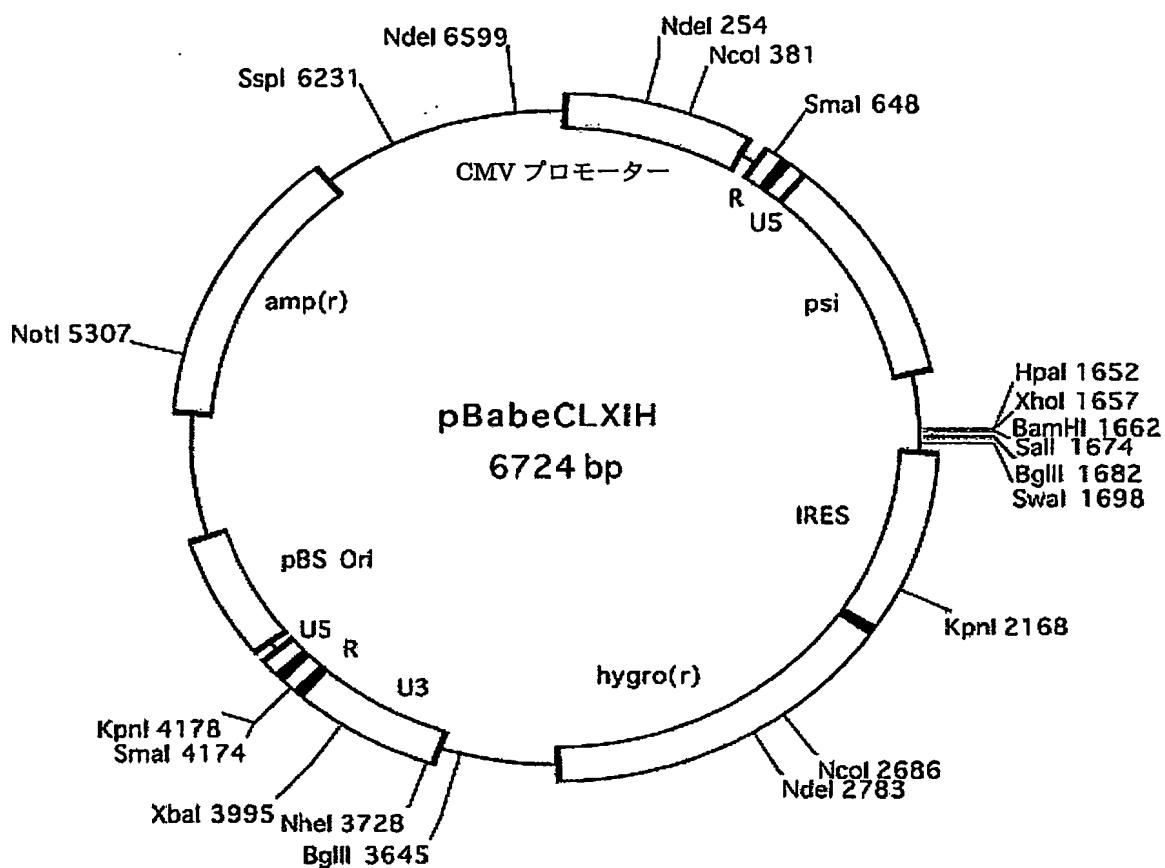


図 5

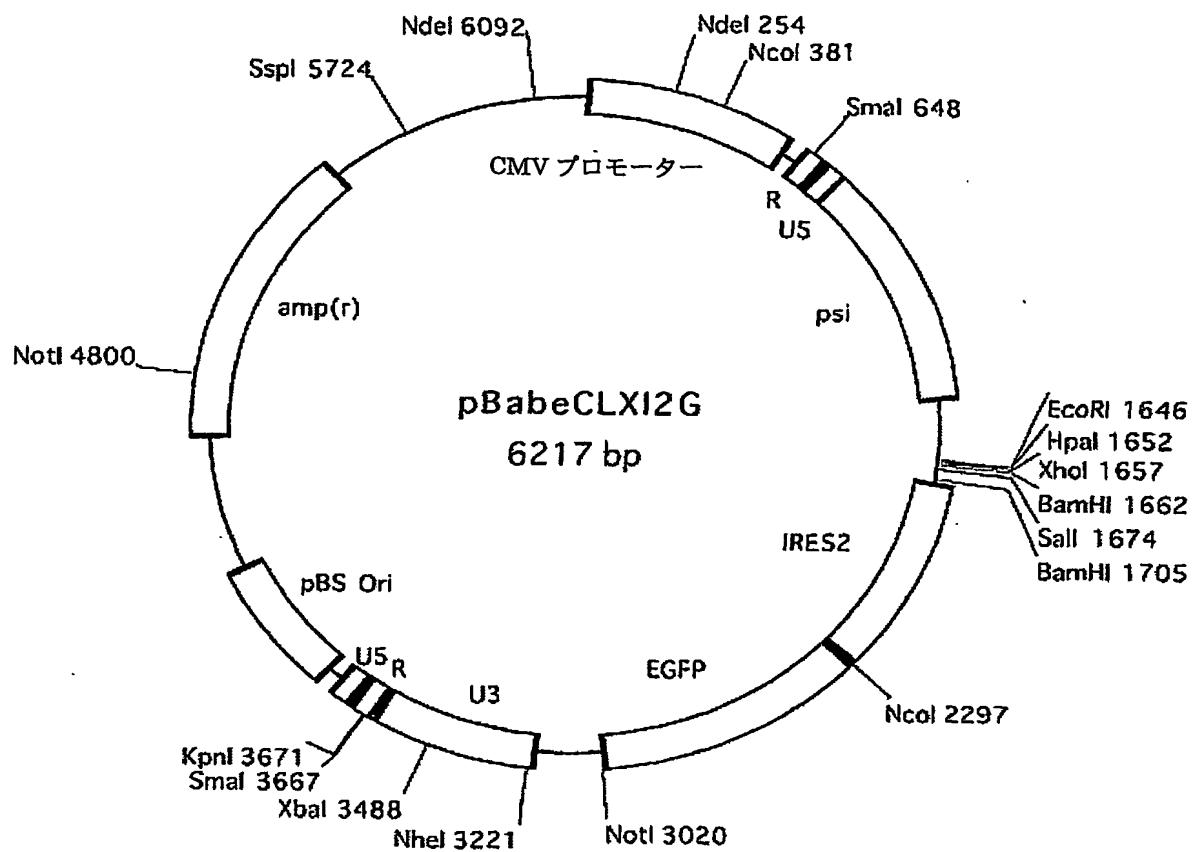


図 6

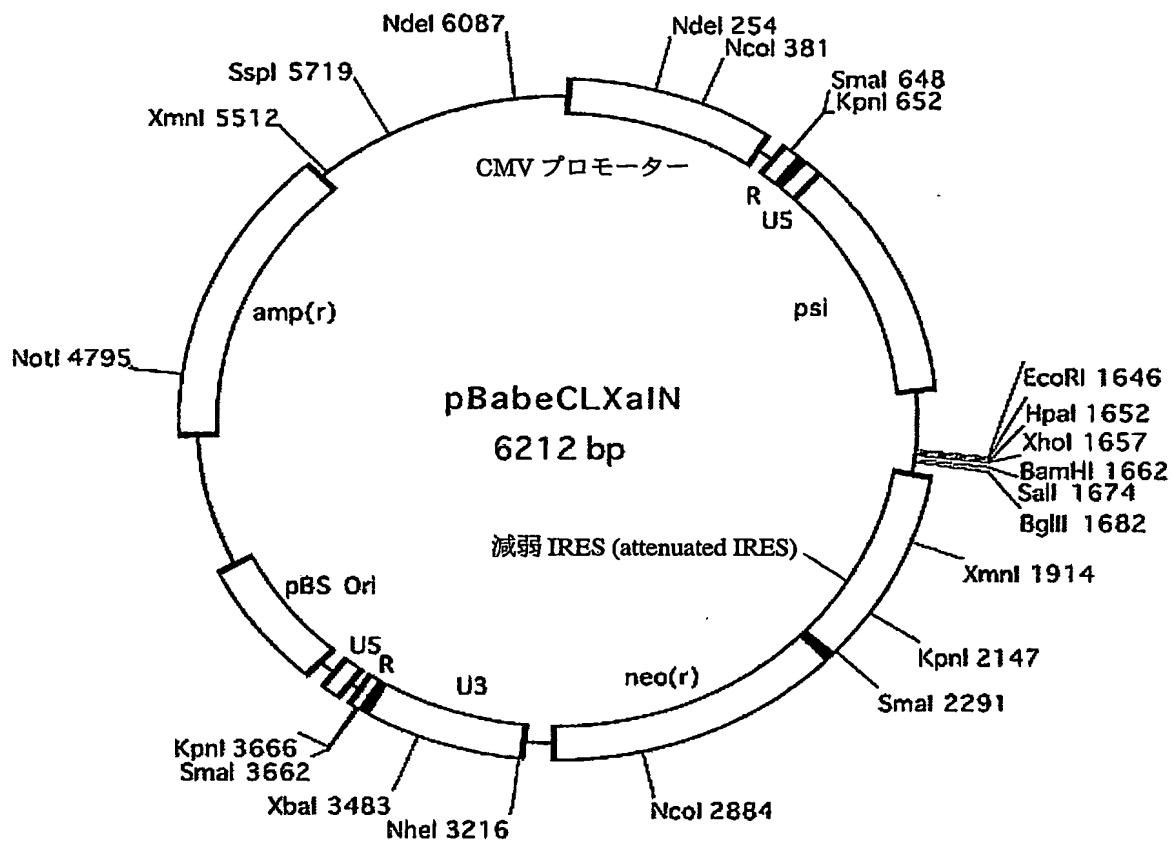


図 7

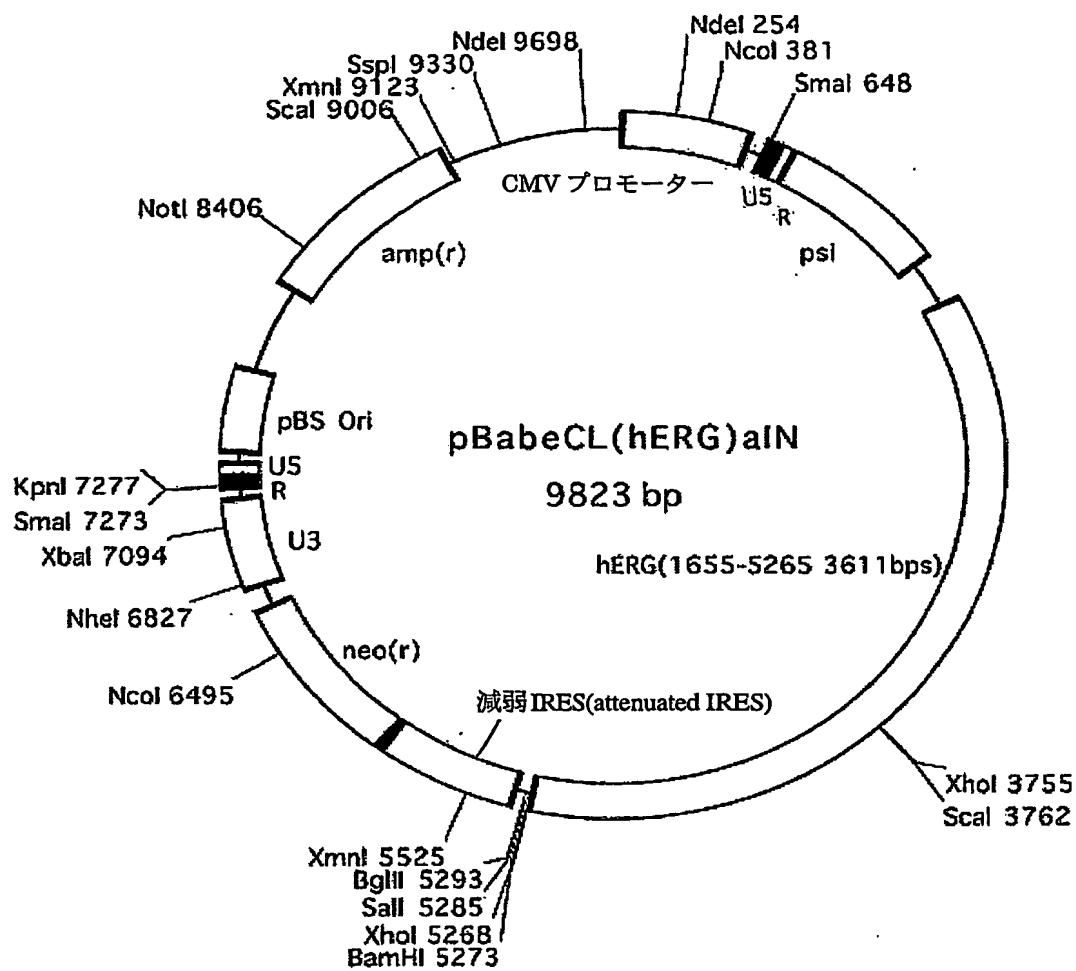


図 8

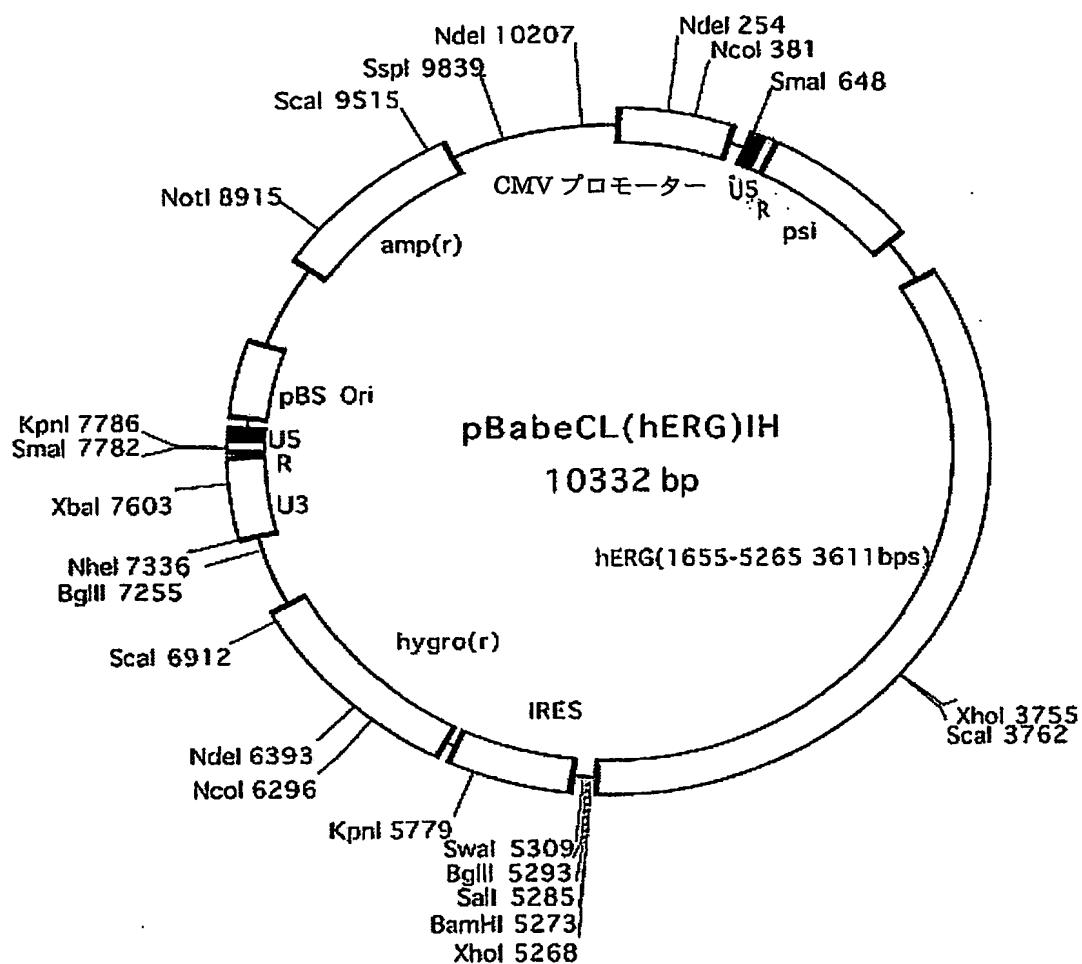
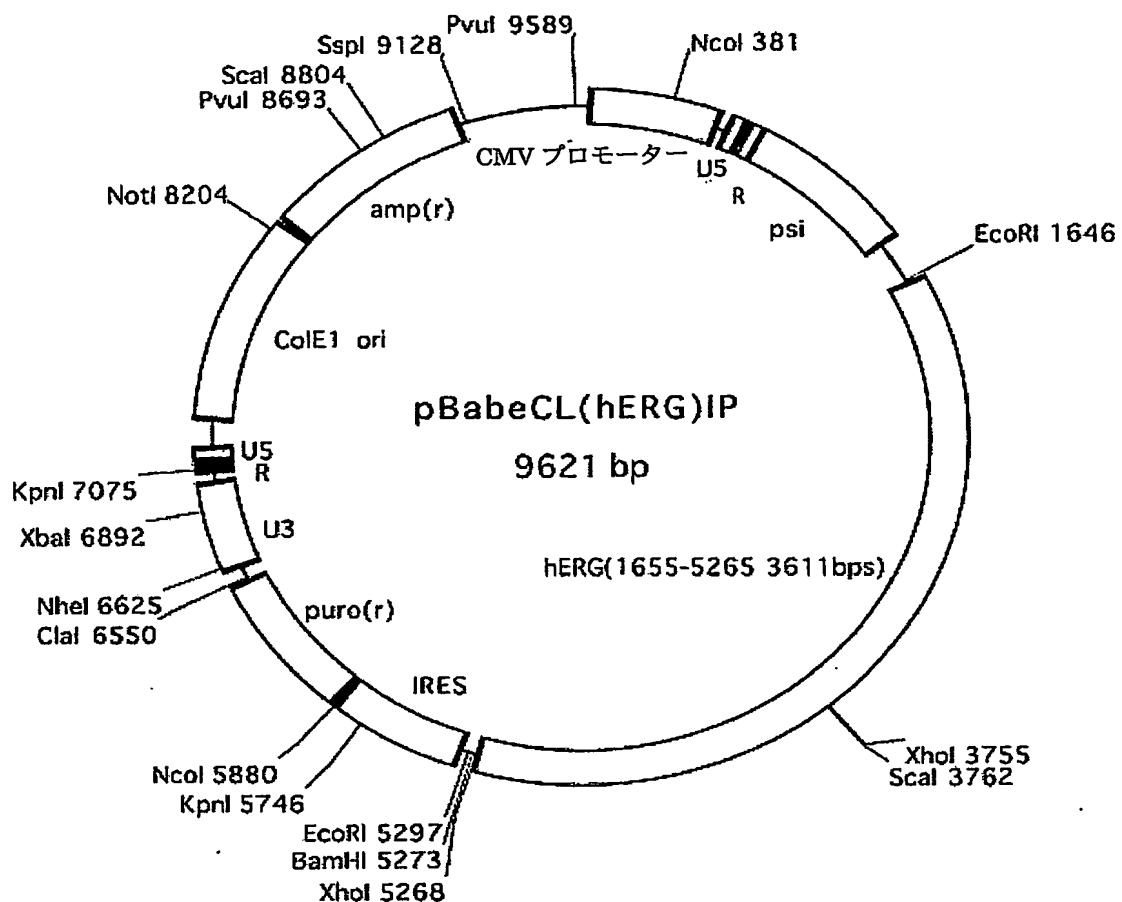


図 9



## 図 10

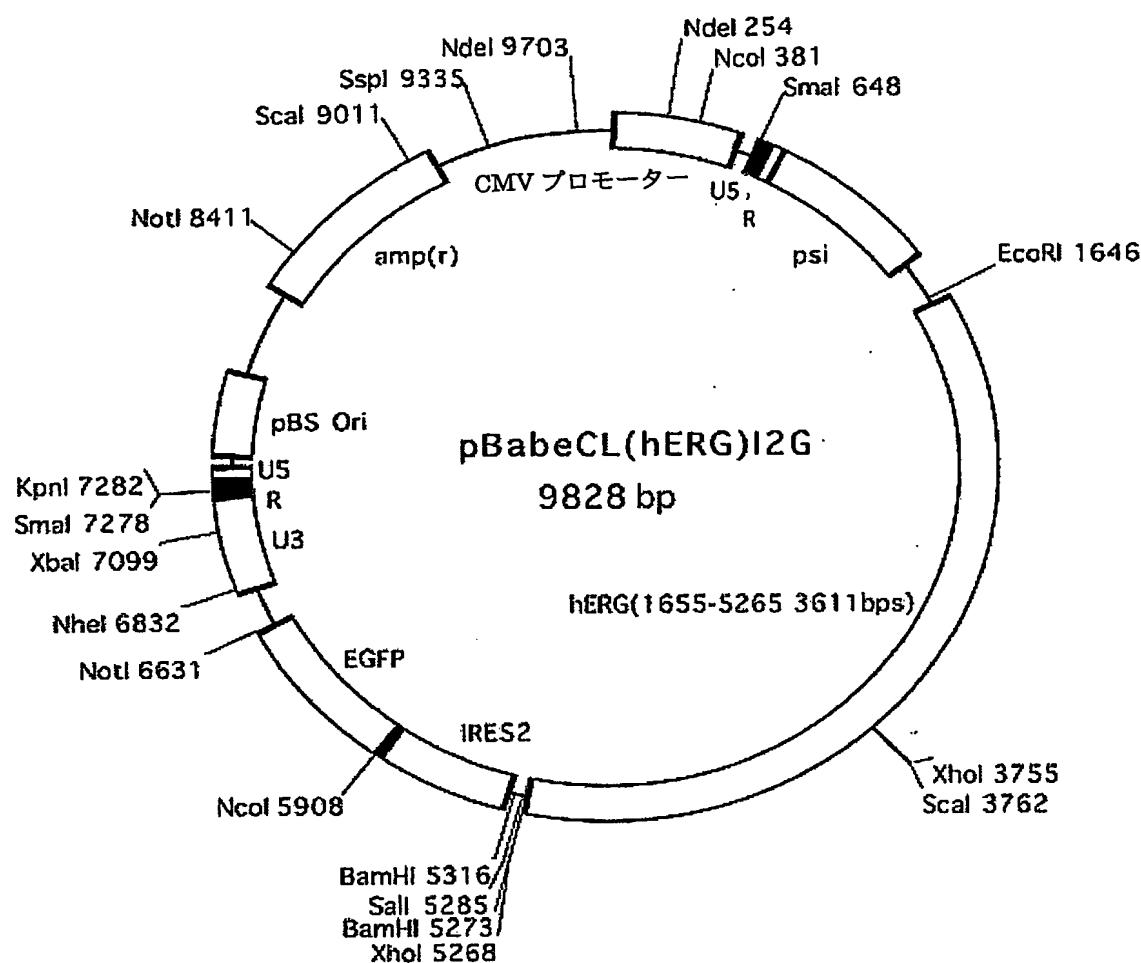


図 11

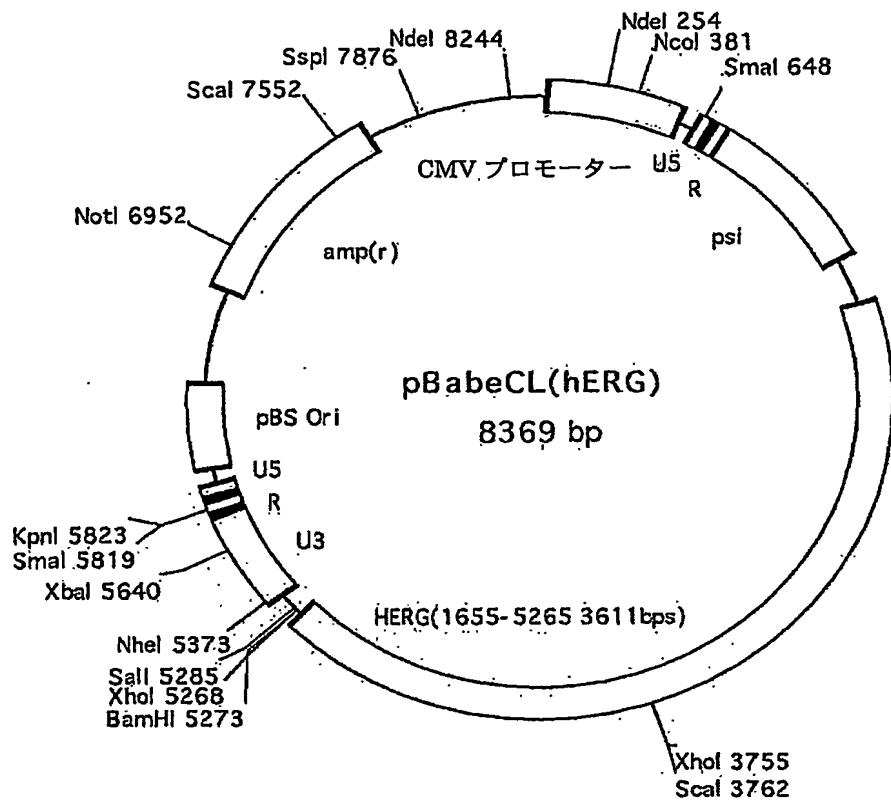


図 1 2

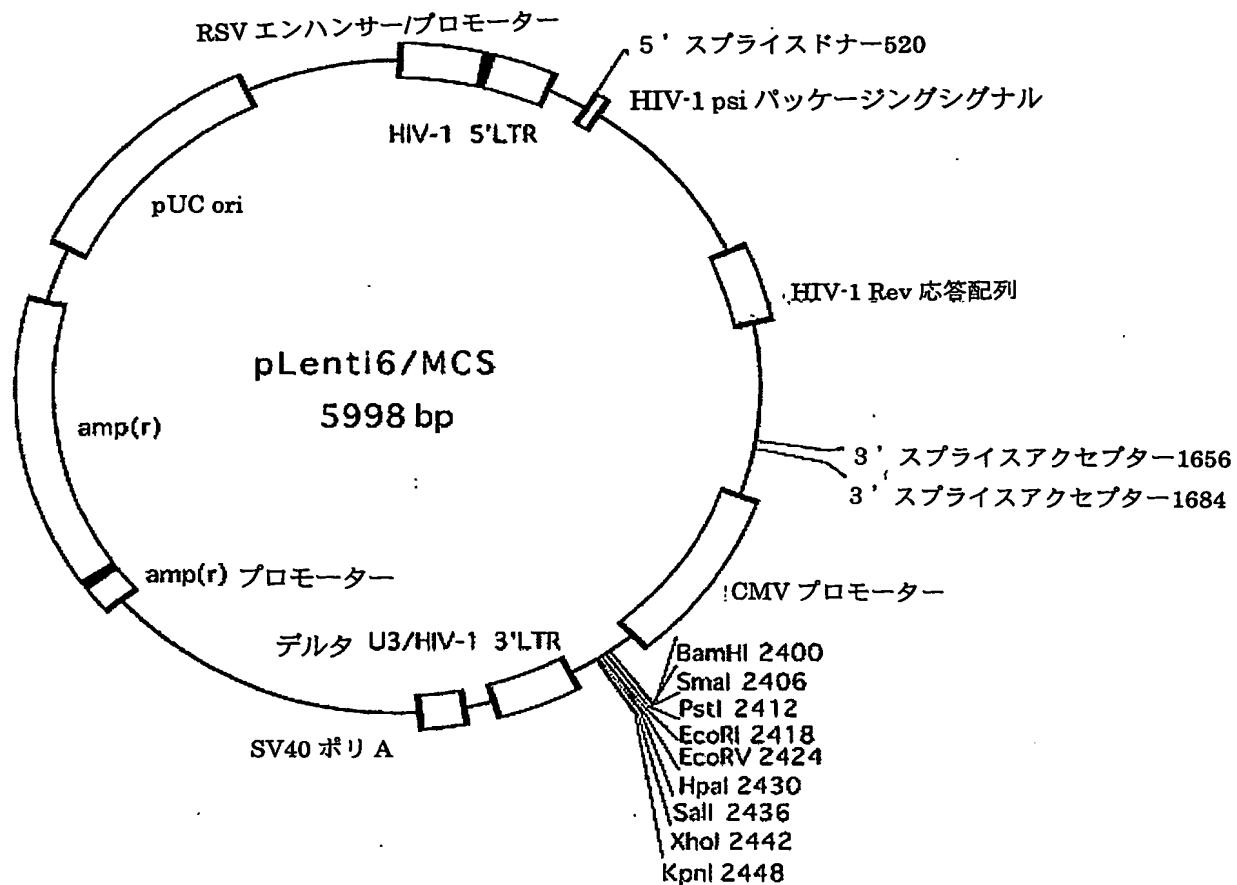


図 13

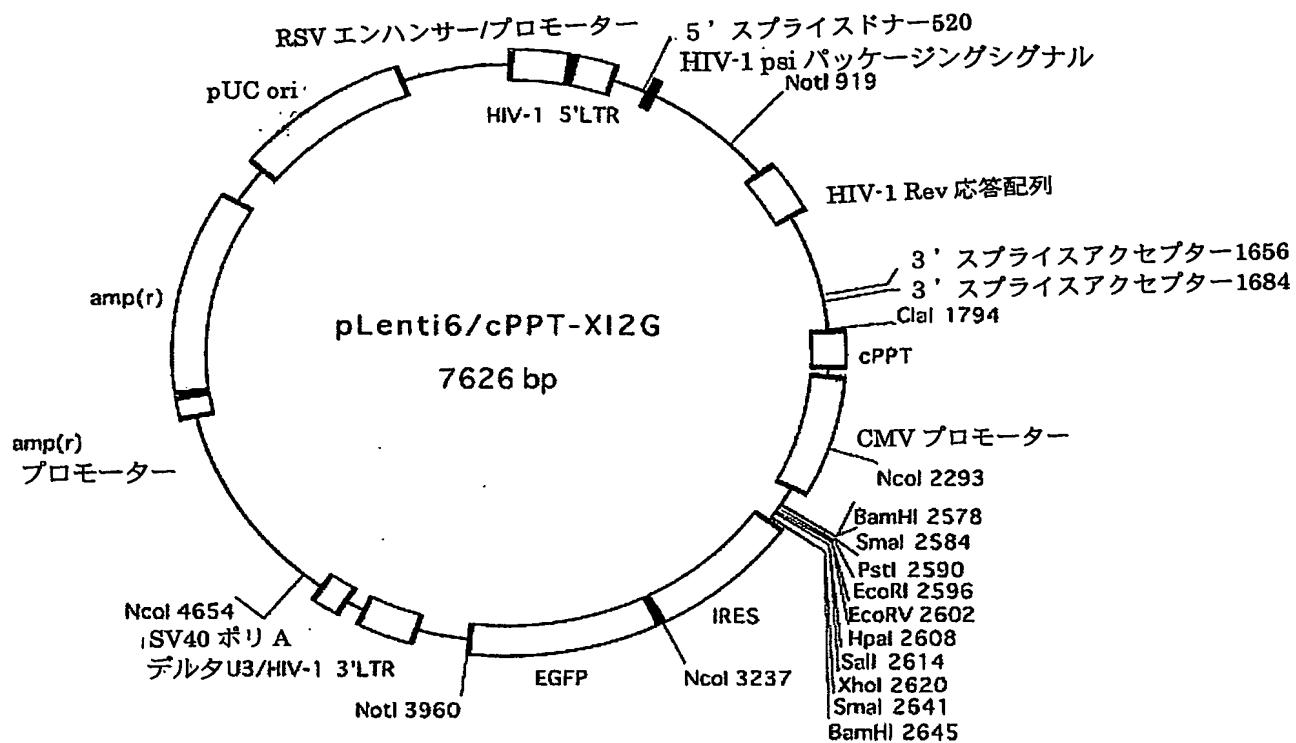


図14

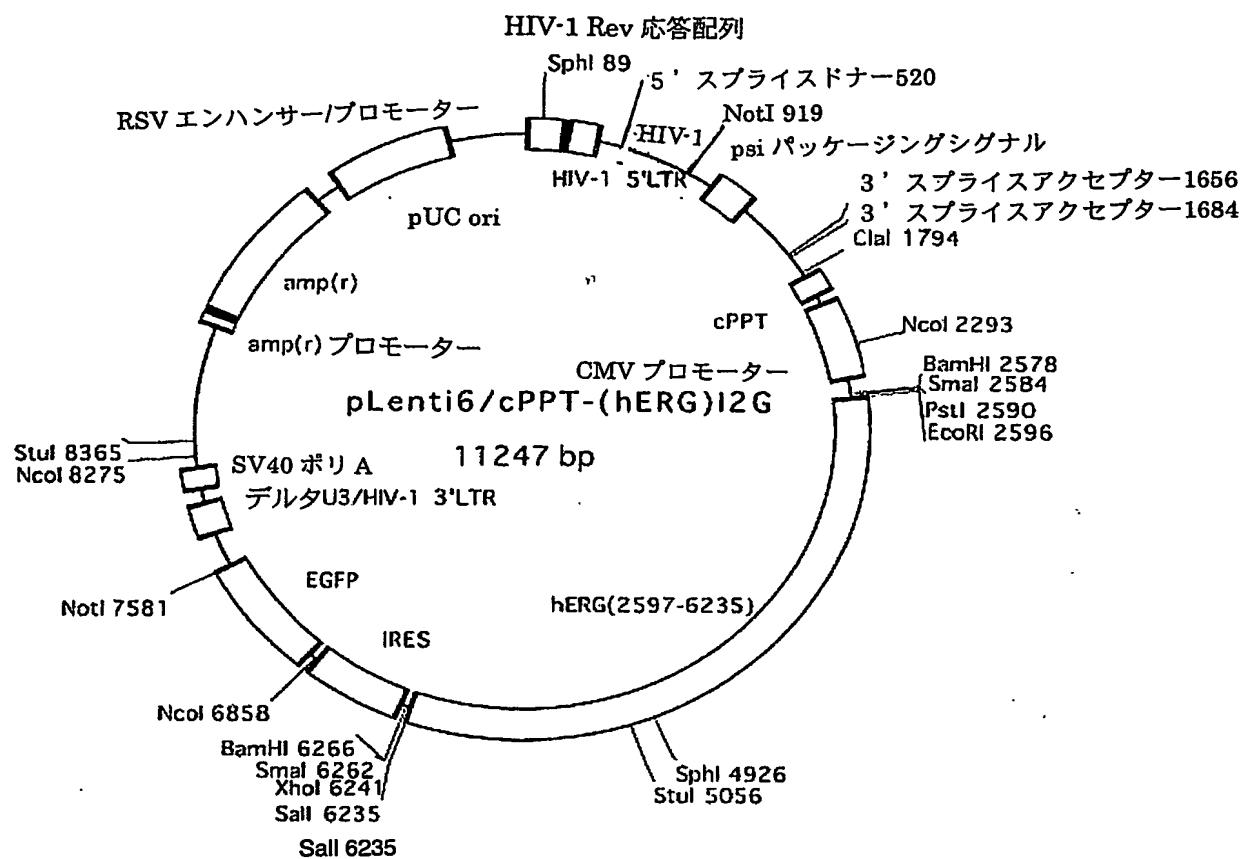


図15

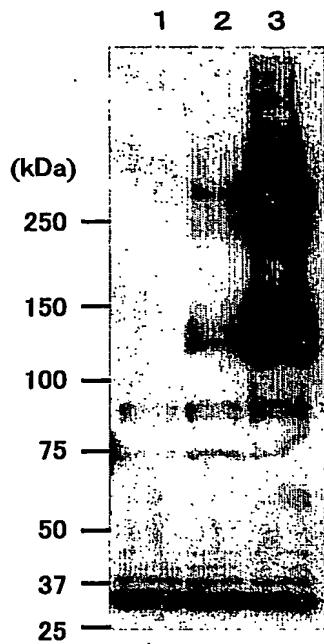
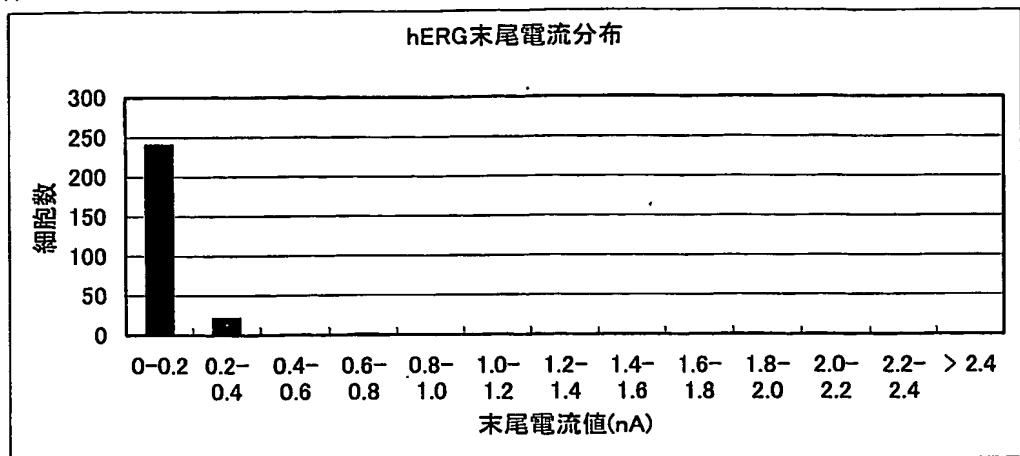
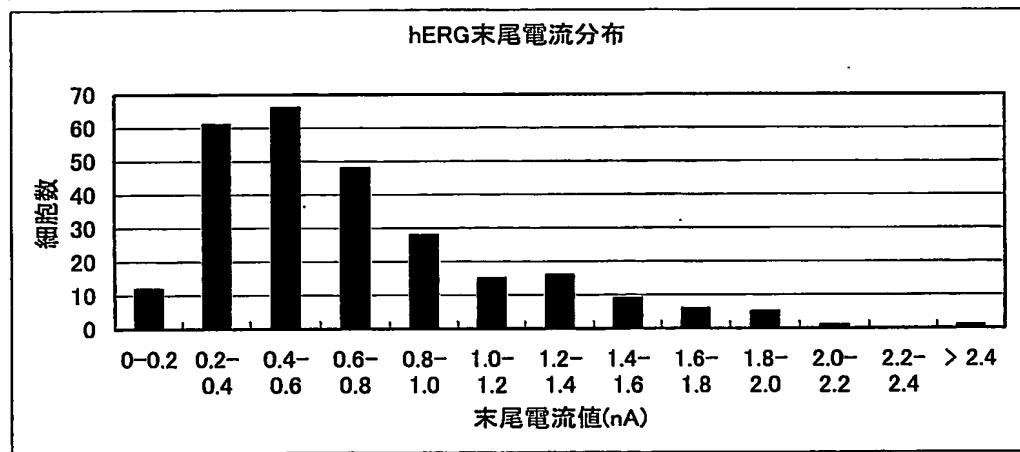


図16

A



B



C

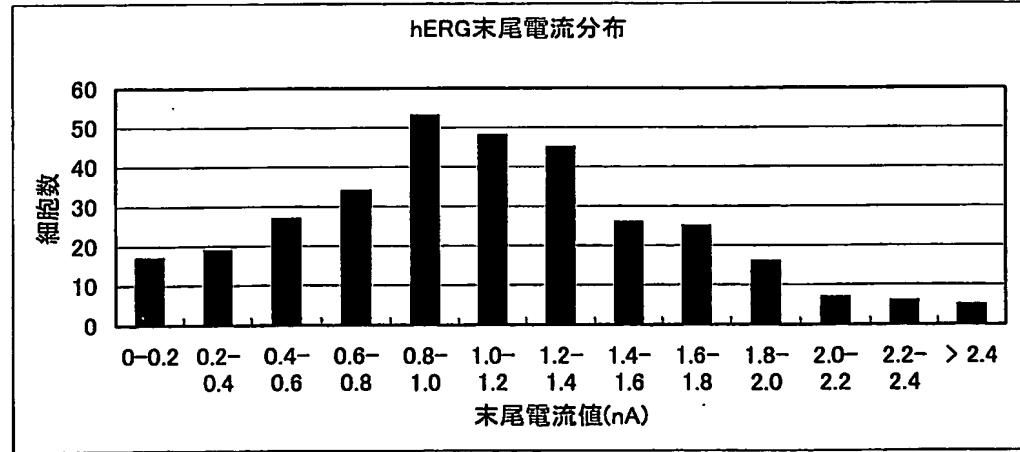
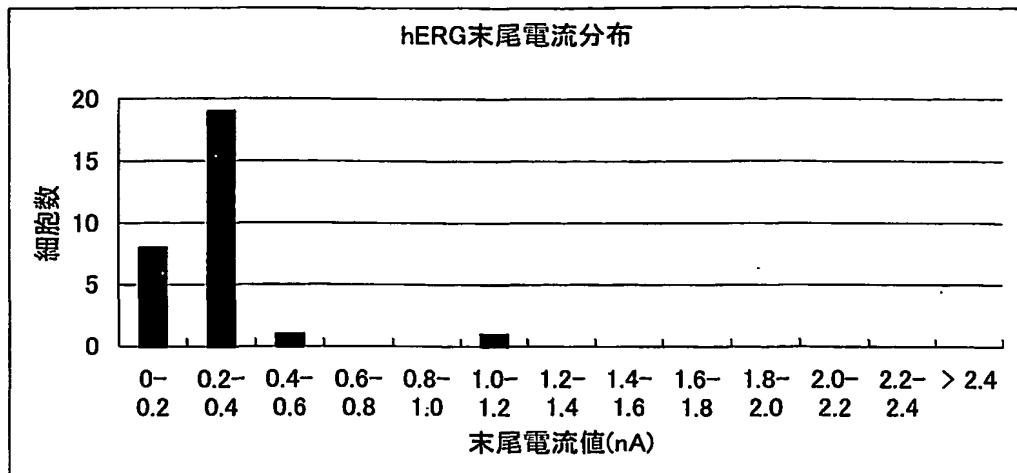
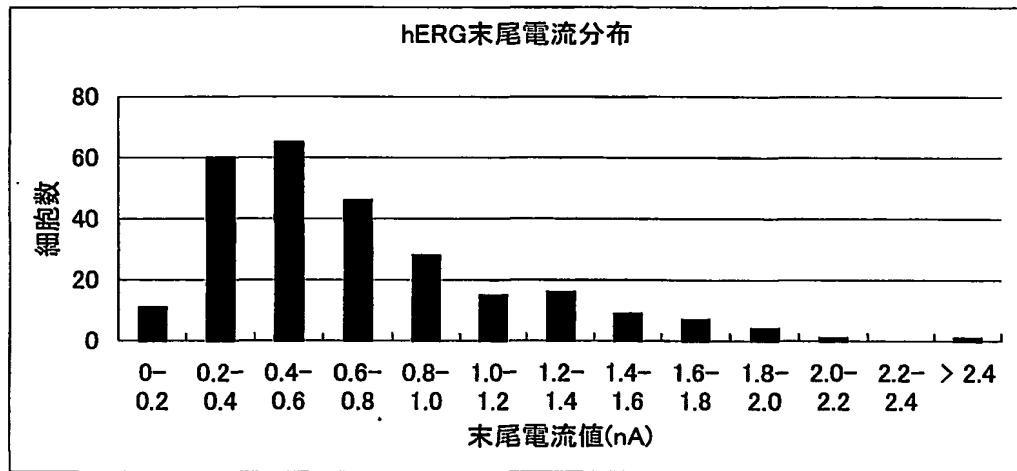


図17

A



B



C

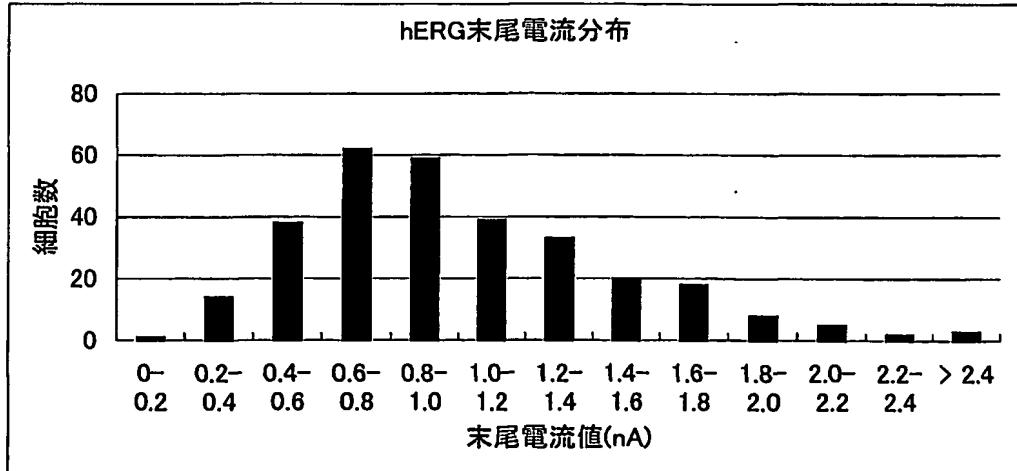
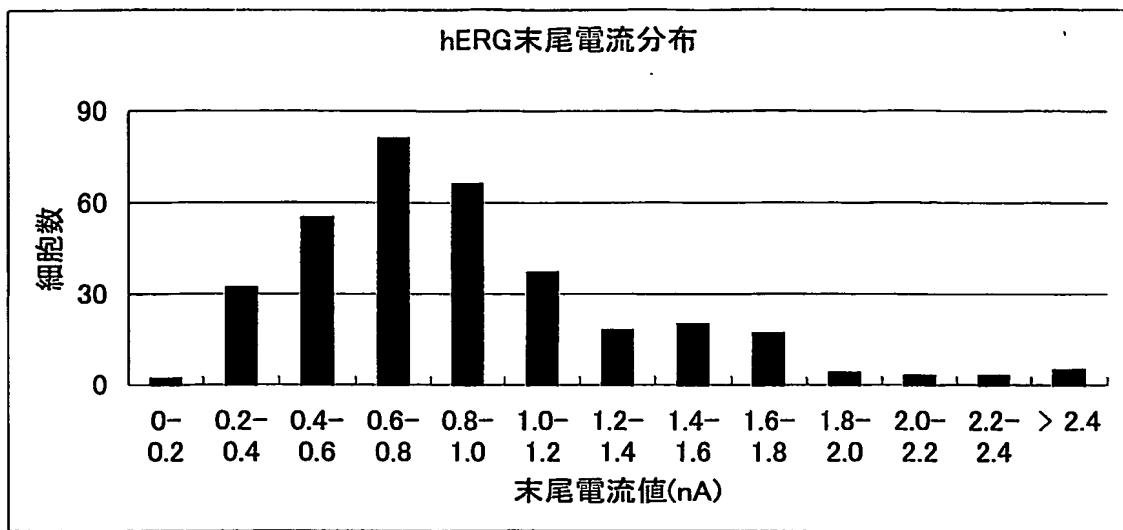


図17のつづき

D



E

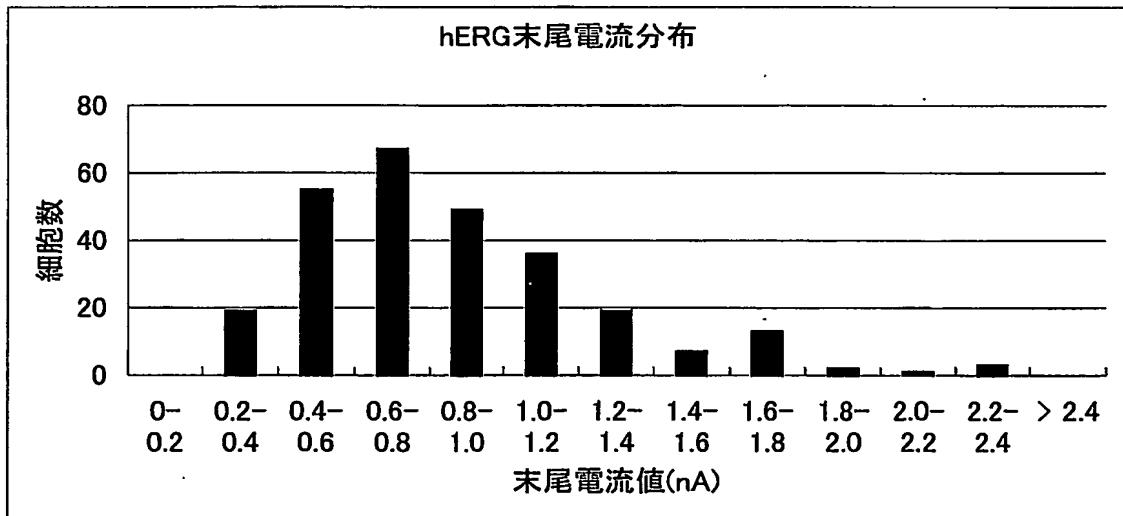


図 18

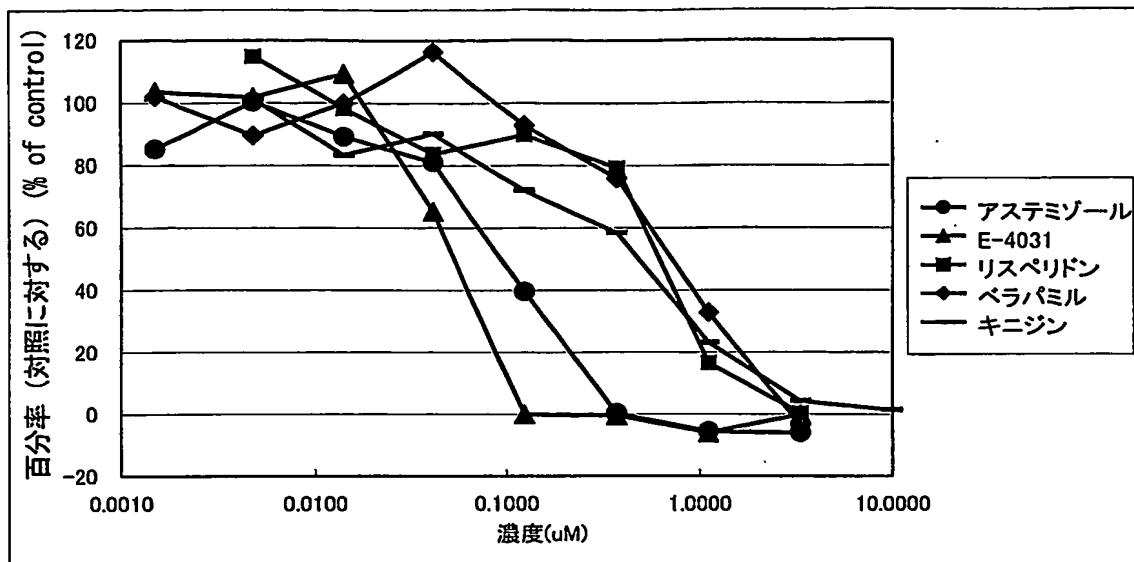
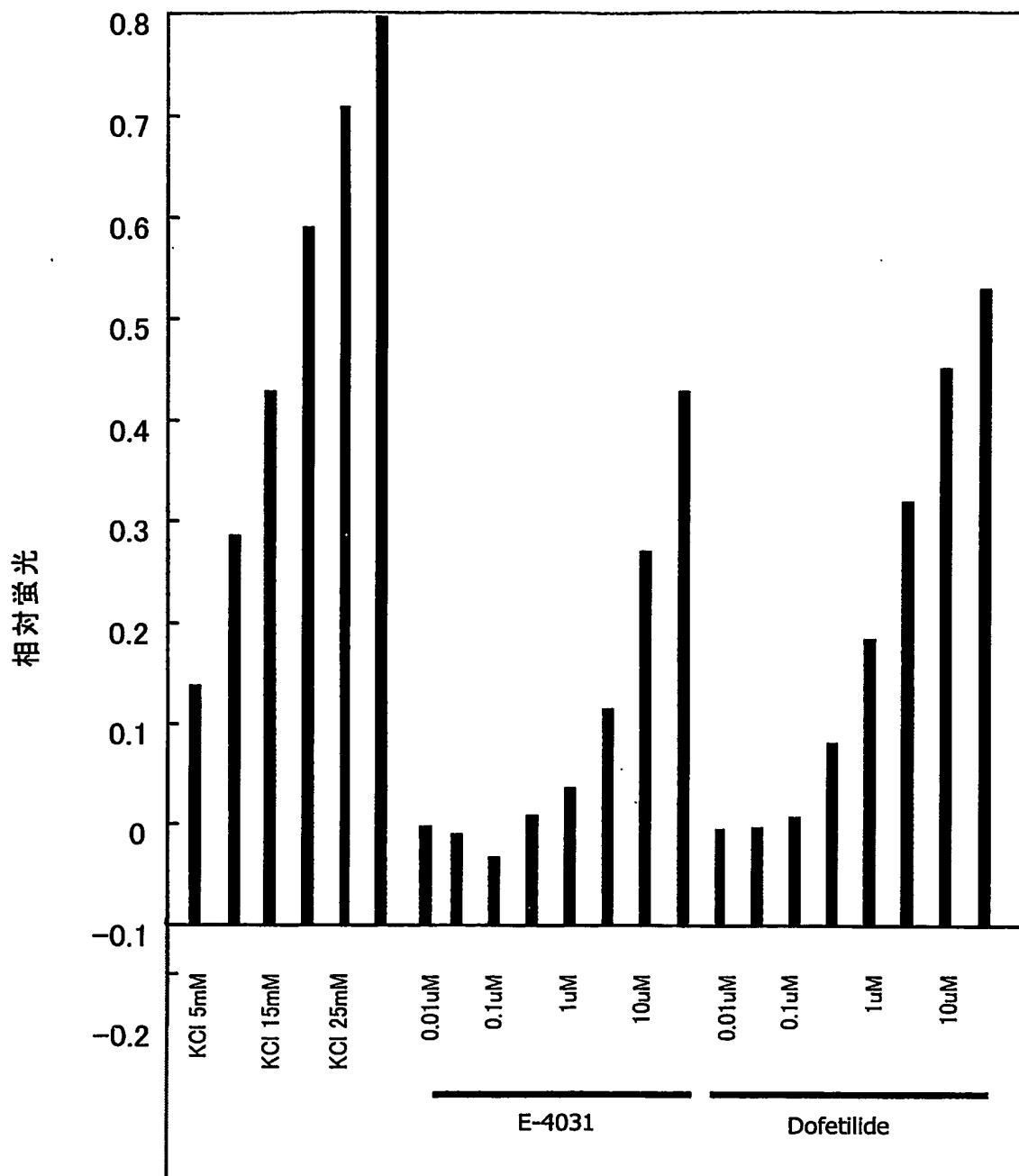


図19



## SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

<120> hERG channel-expressing cell

<130> P03-0162PCT

<150> JP 2003-387255

<151> 2003-11-17

<160> 13

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 4070

<212> DNA

<213> Homo Sapiens.

<220>

<221> CDS

<222> (184)..(3660)

<400> 1

acgcggcctg ctcaggcctc cagcggccgg tcggagggga ggcgggaggc gagcgaggac 60

ccgcggccgc agtccagtct gtgcgcgccc gtgctcgctt ggcgcgggtgc gggaccagcg 120

cgggccaccc gaaggctagt gcgtcgccgg gtgggtgggc cgcggcggcg ccatgggctc 180

agg atg ccg gtg cgg agg ggc cac gtc gcg ccg cag aac acc ttc ctg 228

Met Pro Val Arg Arg Gly His Val Ala Pro Gln Asn Thr Phe Leu

1

5

10

15

gac acc atc atc cgc aag ttt gag ggc cag agc cgt aag ttc atc atc 276

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| Asp Thr Ile Ile Arg Lys Phe Glu Gly Gln Ser Arg Lys Phe Ile Ile |     |     |     |
| 20  | 25  | 30  |     |
|   |     |     |     |
| gcc aac gct cgg gtg gag aac tgc gcc gtc atc tac tgc aac gac ggc |     |     | 324 |
| Ala Asn Ala Arg Val Glu Asn Cys Ala Val Ile Tyr Cys Asn Asp Gly |     |     |     |
| 35  | 40  | 45  |     |
|   |     |     |     |
| ttc tgc gag ctg tgc ggc tac tcg cgg gcc gag gtg atg cag cga ccc |     |     | 372 |
| Phe Cys Glu Leu Cys Gly Tyr Ser Arg Ala Glu Val Met Gln Arg Pro |     |     |     |
| 50  | 55  | 60  |     |
|   |     |     |     |
| tgc acc tgc gac ttc ctg cac ggg ccg cgc acg cag cgc cgc gct gcc |     |     | 420 |
| Cys Thr Cys Asp Phe Leu His Gly Pro Arg Thr Gln Arg Arg Ala Ala |     |     |     |
| 65  | 70  | 75  |     |
|   |     |     |     |
| gcg cag atc gcg cag gca ctg ctg ggc gcc gag gag cgc aaa gtg gaa |     |     | 468 |
| Ala Gln Ile Ala Gln Ala Leu Leu Gly Ala Glu Glu Arg Lys Val Glu |     |     |     |
| 80  | 85  | 90  | 95  |
|   |     |     |     |
| atc gcc ttc tac cgg aaa gat ggg agc tgc ttc cta tgt ctg gtg gat |     |     | 516 |
| Ile Ala Phe Tyr Arg Lys Asp Gly Ser Cys Phe Leu Cys Leu Val Asp |     |     |     |
| 100   | 105 | 110 |     |
|   |     |     |     |
| gtg gtg ccc gtg aag aac gag gat ggg gct gtc atc atg ttc atc ctc |     |     | 564 |
| Val Val Pro Val Lys Asn Glu Asp Gly Ala Val Ile Met Phe Ile Leu |     |     |     |
| 115   | 120 | 125 |     |
|   |     |     |     |
| aat ttc gag gtg gtg atg gag aag gac atg gtg ggg tcc ccg gct cat |     |     | 612 |
| Asn Phe Glu Val Val Met Glu Lys Asp Met Val Gly Ser Pro Ala His |     |     |     |
| 130   | 135 | 140 |     |
|   |     |     |     |
| gac acc aac cac cgg ggc ccc ccc acc agc tgg ctg gcc cca ggc cgc |     |     | 660 |
| Asp Thr Asn His Arg Gly Pro Pro Thr Ser Trp Leu Ala Pro Gly Arg |     |     |     |
| 145   | 150 | 155 |     |
|   |     |     |     |
| gcc aag acc ttc cgc ctg aag ctg ccc gcg ctg ctg gcg ctg acg gcc |     |     | 708 |
| Ala Lys Thr Phe Arg Leu Lys Leu Pro Ala Leu Leu Ala Leu Thr Ala |     |     |     |

| 160  | 165 | 170 | 175 |      |
|--|-----|-----|-----|------|
|  |     |     |     | 756  |
| cgg gag tcg tcg gtg cgg tcg ggc ggc ggc ggc ggc ggc gcc ccg<br>Arg Glu Ser Ser Val Arg Ser Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Pro     |     |     |     |      |
| 180  |     | 185 |     | 190  |
|  |     |     |     | 804  |
| ggg gcc gtg gtg gac gtg gac ctg acg ccc gcg gca ccc agc agc<br>Gly Ala Val Val Val Asp Val Asp Leu Thr Pro Ala Ala Pro Ser Ser     |     |     |     |      |
| 195  |     | 200 |     | 205  |
|  |     |     |     | 852  |
| gag tcg ctg gcc ctg gac gaa gtg aca gcc atg gac aac cac gtg gca<br>Glu Ser Leu Ala-Leu Asp Glu Val Thr Ala Met Asp Asn His Val Ala |     |     |     |      |
| 210  |     | 215 |     | 220  |
|  |     |     |     | 900  |
| ggg ctc ggg ccc gcg gag gag cgg cgt gcg ctg gtg ggt ccc ggc tct<br>Gly Leu Gly Pro Ala Glu Glu Arg Arg Ala Leu Val Gly Pro Gly Ser |     |     |     |      |
| 225  |     | 230 |     | 235  |
|  |     |     |     | 948  |
| ccg ccc cgc agc gcg ccc ggc cag ctc cca tcg ccc cgg gcg cac agc<br>Pro Pro Arg Ser Ala Pro Gly Gln Leu Pro Ser Pro Arg Ala His Ser |     |     |     |      |
| 240  |     | 245 |     | 250  |
|  |     |     |     | 255  |
|  |     |     |     | 996  |
| ctc aac ccc gac gcc tcg ggc tcc agc tgc agc ctg gcc cgg acg cgc<br>Leu Asn Pro Asp Ala Ser Gly Ser Ser Cys Ser Leu Ala Arg Thr Arg |     |     |     |      |
| 260  |     | 265 |     | 270  |
|  |     |     |     | 1044 |
| tcc cga gaa agc tgc gcc agc gtg cgc cgc gcc tcg tcg gcc gac gac<br>Ser Arg Glu Ser Cys Ala Ser Val Arg Arg Ala Ser Ser Ala Asp Asp |     |     |     |      |
| 275  |     | 280 |     | 285  |
|  |     |     |     | 1092 |
| atc gag gcc atg cgc gcc ggg gtg ctg ccc ccg cca ccg cgc cac gcc<br>Ile Glu Ala Met Arg Ala Gly Val Leu Pro Pro Pro Arg His Ala     |     |     |     |      |
| 290  |     | 295 |     | 300  |
|  |     |     |     | 1140 |
| agc acc ggg gcc atg cac cca ctg cgc agc ggc ttg ctc aac tcc acc<br>Ser Thr Gly Ala Met His Pro Leu Arg Ser Gly Leu Leu Asn Ser Thr |     |     |     |      |
| 305  |     | 310 |     | 315  |

|   |     |     |      |
|---|-----|-----|------|
| tcg gac tcc gac ctc gtg cgc tac cgc acc att agc aag att ccc caa |     |     | 1188 |
| Ser Asp Ser Asp Leu Val Arg Tyr Arg Thr Ile Ser Lys Ile Pro Gln |     |     |      |
| 320   | 325 | 330 | 335  |
| atc acc ctc aac ttt gtg gac ctc aag ggc gac ccc ttc ttg gct tcg |     |     | 1236 |
| Ile Thr Leu Asn Phe Val Asp Leu Lys Gly Asp Pro Phe Leu Ala Ser |     |     |      |
| 340   | 345 | 350 |      |
| ccc acc agt gac cgt gag atc ata gca cct aag ata aag gag cga acc |     |     | 1284 |
| Pro Thr Ser Asp Arg Glu Ile Ile Ala Pro Lys Ile Lys Glu Arg Thr |     |     |      |
| 355   | 360 | 365 |      |
| cac aat gtc act gag aag gtc acc cag gtc ctg tcc ctg ggc gcc gac |     |     | 1332 |
| His Asn Val Thr Glu Lys Val Thr Gln Val Leu Ser Leu Gly Ala Asp |     |     |      |
| 370   | 375 | 380 |      |
| gtg ctg cct gag tac aag ctg cag gca ccg cgc atc cac cgc tgg acc |     |     | 1380 |
| Val Leu Pro Glu Tyr Lys Leu Gln Ala Pro Arg Ile His Arg Trp Thr |     |     |      |
| 385   | 390 | 395 |      |
| atc ctg cat tac agc ccc ttc aag gcc gtg tgg gac tgg ctc atc ctg |     |     | 1428 |
| Ile Leu His Tyr Ser Pro Phe Lys Ala Val Trp Asp Trp Leu Ile Leu |     |     |      |
| 400   | 405 | 410 | 415  |
| ctg ctg gtc atc tac acg gct gtc ttc aca ccc tac tcg gct gcc ttc |     |     | 1476 |
| Leu Leu Val Ile Tyr Thr Ala Val Phe Thr Pro Tyr Ser Ala Ala Phe |     |     |      |
| 420   | 425 | 430 |      |
| ctg ctg aag gag acg gaa gaa ggc ccg cct gct acc gag tgt ggc tac |     |     | 1524 |
| Leu Leu Lys Glu Thr Glu Glu Gly Pro Pro Ala Thr Glu Cys Gly Tyr |     |     |      |
| 435   | 440 | 445 |      |
| gcc tgc cag ccg ctg gct gtg gtg gac ctc atc gtg gac atc atg ttc |     |     | 1572 |
| Ala Cys Gln Pro Leu Ala Val Val Asp Leu Ile Val Asp Ile Met Phe |     |     |      |
| 450   | 455 | 460 |      |

|   |     |     |      |
|---|-----|-----|------|
| att gtg gac atc ctc atc aac ttc cgc acc acc tac gtc aat gcc aac |     |     | 1620 |
| Ile Val Asp Ile Leu Ile Asn Phe Arg Thr Thr Tyr Val Asn Ala Asn |     |     |      |
| 465   | 470 | 475 |      |
|   |     |     |      |
| gag gag gtg gtc agc cac ccc ggc cgc atc gcc gtc cac tac ttc aag |     |     | 1668 |
| Glu Glu Val Val Ser His Pro Gly Arg Ile Ala Val His Tyr Phe Lys |     |     |      |
| 480   | 485 | 490 | 495  |
|   |     |     |      |
| ggc tgg ttc ctc atc gac atg gtg gcc gcc atc ccc ttc gac ctg ctc |     |     | 1716 |
| Gly Trp Phe Leu Ile Asp Met Val Ala Ala Ile Pro Phe Asp Leu Leu |     |     |      |
| 500   | 505 | 510 |      |
|   |     |     |      |
| atc ttc ggc tct ggc tct gag gag ctg atc ggg ctg ctg aag act gcg |     |     | 1764 |
| Ile Phe Gly Ser Gly Ser Glu Glu Leu Ile Gly Leu Leu Lys Thr Ala |     |     |      |
| 515   | 520 | 525 |      |
|   |     |     |      |
| cgg ctg ctg cgg ctg gtg cgc gtg gcg cgg aag ctg gat cgc tac tca |     |     | 1812 |
| Arg Leu Leu Arg Leu Val Arg Val Ala Arg Lys Leu Asp Arg Tyr Ser |     |     |      |
| 530   | 535 | 540 |      |
|   |     |     |      |
| gag tac ggc gcg gcc gtg ctg ttc ttg ctc atg tgc acc ttt gcg ctc |     |     | 1860 |
| Glu Tyr Gly Ala Ala Val Leu Phe Leu Leu Met Cys Thr Phe Ala Leu |     |     |      |
| 545   | 550 | 555 |      |
|   |     |     |      |
| atc gcg cac tgg cta gcc tgc atc tgg tac gcc atc ggc aac atg gag |     |     | 1908 |
| Ile Ala His Trp Leu Ala Cys Ile Trp Tyr Ala Ile Gly Asn Met Glu |     |     |      |
| 560   | 565 | 570 | 575  |
|   |     |     |      |
| cag cca cac atg gac tca cgc atc ggc tgg ctg cac aac ctg ggc gac |     |     | 1956 |
| Gln Pro His Met Asp Ser Arg Ile Gly Trp Leu His Asn Leu Gly Asp |     |     |      |
| 580   | 585 | 590 |      |
|   |     |     |      |
| cag ata ggc aaa ccc tac aac agc agc ggc ctg ggc ggc ccc tcc atc |     |     | 2004 |
| Gln Ile Gly Lys Pro Tyr Asn Ser Ser Gly Leu Gly Gly Pro Ser Ile |     |     |      |
| 595   | 600 | 605 |      |
|   |     |     |      |
| aag gac aag tat gtg acg gcg ctc tac ttc acc ttc agc agc ctc acc |     |     | 2052 |

|   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| Lys   | Asp | Lys | Tyr | Val | Thr | Ala | Leu | Tyr | Phe | Thr | Phe | Ser | Ser | Leu | Thr |      |     |
| 610   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 620 |      |     |
| agt gtg ggc ttc ggc aac gtc tct ccc aac acc aac tca gag aag atc   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 2100 |     |
| Ser   | Val | Gly | Phe | Gly | Asn | Val | Ser | Pro | Asn | Thr | Asn | Ser | Glu | Lys | Ile |      |     |
| 625   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 635 |      |     |
| ttc tcc atc tgc gtc atg ctc att ggc tcc ctc atg tat gct agc atc   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 2148 |     |
| Phe   | Ser | Ile | Cys | Val | Met | Leu | Ile | Gly | Ser | Leu | Met | Tyr | Ala | Ser | Ile |      |     |
| 640   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 650 |      | 655 |
| ttc ggc aac gtg tcg gcc atc atc cag cgg ctg tac tcg ggc aca gcc   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 2196 |     |
| Phe   | Gly | Asn | Val | Ser | Ala | Ile | Ile | Gln | Arg | Leu | Tyr | Ser | Gly | Thr | Ala |      |     |
| 660   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 665 |      | 670 |
| cgc tac cac aca cag atg ctg cgg gtg cgg gag ttc atc cgc ttc cac   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 2244 |     |
| Arg   | Tyr | His | Thr | Gln | Met | Leu | Arg | Val | Arg | Glu | Phe | Ile | Arg | Phe | His |      |     |
| 675   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 680 |      | 685 |
| cag atc ccc aat ccc ctg cgc cag cgc ctc gag gag tac ttc cag cac   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 2292 |     |
| Gln   | Ile | Pro | Asn | Pro | Leu | Arg | Gln | Arg | Leu | Glu | Glu | Tyr | Phe | Gln | His |      |     |
| 690   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 695 |      | 700 |
| gcc tgg tcc tac acc aac ggc atc gac atg aac gcg gtg ctg aag ggc   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 2340 |     |
| Ala   | Trp | Ser | Tyr | Thr | Asn | Gly | Ile | Asp | Met | Asn | Ala | Val | Leu | Lys | Gly |      |     |
| 705   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 710 |      | 715 |
| ttc cct gag tgc ctg cag gct gac atc tgc ctg cac ctg aac cgc tca   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 2388 |     |
| Phe   | Pro | Glu | Cys | Leu | Gln | Ala | Asp | Ile | Cys | Leu | His | Leu | Asn | Arg | Ser |      |     |
| 720   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 725 |      | 730 |
| ctg ctg cag cac tgc aaa ccc ttc cga ggg gcc acc aag ggc tgc ctt   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 2436 |     |
| Leu   | Leu | Gln | His | Cys | Lys | Pro | Phe | Arg | Gly | Ala | Thr | Lys | Gly | Cys | Leu |      |     |
| 740   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 745 |      | 750 |
| cggtt ggc ctg gcc atg aag ttc aag acc aca cat gca ccg cca ggg gac |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 2484 |     |
| Arg   | Ala | Leu | Ala | Met | Lys | Phe | Lys | Thr | Thr | His | Ala | Pro | Pro | Gly | Asp |      |     |

| 755   | 760 | 765 |      |
|---|-----|-----|------|
| aca ctg gtg cat gct ggg gac ctg ctc acc gcc ctg tac ttc atc tcc   |     |     | 2532 |
| Thr Leu Val His Ala Gly Asp Leu Leu Thr Ala Leu Tyr Phe Ile Ser   |     |     |      |
| 770   | 775 | 780 |      |
| cg <del>g</del> ggc tcc atc gag atc ctg cg <del>g</del> ggc gac gtc gtc gt <del>g</del> gcc atc ctg                         |     |     | 2580 |
| Arg Gly Ser Ile Glu Ile Leu Arg Gly Asp Val Val Val Ala Ile Leu   |     |     |      |
| 785   | 790 | 795 |      |
| gg <del>g</del> aag aat gac atc ttt gg <del>g</del> gag cct ctg aac ctg tat gca agg cct                                     |     |     | 2628 |
| Gly Lys Asn Asp Ile Phe Gly Glu Pro Leu Asn Leu Tyr Ala Arg Pro.  |     |     |      |
| 800   | 805 | 810 | 815  |
| ggc aag tcg aac gg <del>g</del> gat gt <del>g</del> cg <del>g</del> gcc ctc acc tac tgt gac cta cac                         |     |     | 2676 |
| Gly Lys Ser Asn Gly Asp Val Arg Ala Leu Thr Tyr Cys Asp Leu His   |     |     |      |
| 820   | 825 | 830 |      |
| aag atc cat cg <del>g</del> gac gac ctg ctg gag gt <del>g</del> ctg gac atg tac cct gag                                     |     |     | 2724 |
| Lys Ile His Arg Asp Asp Leu Leu Glu Val Leu Asp Met Tyr Pro Glu   |     |     |      |
| 835   | 840 | 845 |      |
| ttc tcc gac cac ttc tgg tcc agc ctg gag atc acc ttc aac ctg cga   |     |     | 2772 |
| Phe Ser Asp His Phe Trp Ser Ser Leu Glu Ile Thr Phe Asn Leu Arg   |     |     |      |
| 850   | 855 | 860 |      |
| gat acc aac atg atc ccg gg <del>c</del> tcc ccc gg <del>c</del> agt acg gag tta gag ggt                                     |     |     | 2820 |
| Asp Thr Asn Met Ile Pro Gly Ser Pro Gly Ser Thr Glu Leu Glu Gly   |     |     |      |
| 865   | 870 | 875 |      |
| ggc ttc agt cg <del>g</del> caa cg <del>c</del> aag cg <del>c</del> aag ttg tcc ttc cg <del>c</del> agg cg <del>c</del> acg |     |     | 2868 |
| Gly Phe Ser Arg Gln Arg Lys Arg Lys Leu Ser Phe Arg Arg Arg Thr   |     |     |      |
| 880   | 885 | 890 | 895  |
| gac aag gac acg gag cag cca gg <del>g</del> gag gt <del>g</del> tcg gcc ttg gg <del>g</del> ccg gg <del>c</del>             |     |     | 2916 |
| Asp Lys Asp Thr Glu Gln Pro Gly Glu Val Ser Ala Leu Gly Pro Gly   |     |     |      |
| 900   | 905 | 910 |      |

|   |      |      |     |     |     |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |
|---|------|------|-----|-----|-----|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| cgg gcg ggg gca ggg ccg agt agc                 | cg   | gg   | cc  | gg  | tt  | 2964 |      |      |     |     |     |     |     |     |     |
| Arg Ala Gly Ala Gly Pro Ser Ser Arg             | Gly  | Arg  | Gly | Pro | Gly | Pro  | Trp  |      |     |     |     |     |     |     |     |
| 915   | 920  | 925  |     |     |     |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |
| ggg gag agc ccg tcc agt ggc ccc tcc             | ag   | c    | ct  | ga  | ag  | ga   | 3012 |      |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly Glu Ser Pro Ser Ser Gly Pro Ser Ser Pro     | Glu  | Ser  | Pro | Ser | Ser | Glu  | Asp  |      |     |     |     |     |     |     |     |
| 930   | 935  | 940  |     |     |     |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |
| gag ggc cca ggc cgc agc tcc agc ccc ctc         | cg   | ct   | gt  | cc  | tt  | cc   | 3060 |      |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu Gly Pro Gly Arg Ser Ser Pro Leu Arg Leu Val | Gly  | Pro  | Gly | Arg | Ser | Ser  | Pro  | Phe  | Ser |     |     |     |     |     |     |
| 945   | 950  | 955  |     |     |     |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |
| agc ccc agg ccc gga gag ccg ccg ggt             | gg   | gg   | cc  | cc  | ct  | at   | 3108 |      |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser Pro Arg Pro Pro Gly Glu Pro Pro Gly Gly     | Gly  | Arg  | Ser | Ser | Pro | Leu  | Arg  | Leu  | Val | Pro | Phe | Ser |     |     |     |
| 960   | 965  | 970  | 975 |     |     |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |
| gac tgc gag aag agc agc gac act tgc aac         | cc   | ct   | tg  | tc  | gg  | cc   | tt   | 3156 |     |     |     |     |     |     |     |
| Asp Cys Glu Lys Ser Ser Asp Thr Cys Asn Pro     | Glu  | Lys  | Ser | Ser | Asp | Thr  | Cys  | Asn  | Pro | Leu | Ser | Gly | Ala | Phe |     |
| 980   | 985  | 990  |     |     |     |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |
| tca gga gtg tcc aac att ttc agc ttc             | tt   | gg   | gg  | gg  | gg  | gg   | cc   | 3204 |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser Gly Val Ser Asn Ile Phe Ser Phe Trp         | Gly  | Val  | Ser | Asn | Ile | Phe  | Ser  | Phe  | Trp | Gly | Asp | Ser | Arg | Gly | Arg |
| 995   | 1000 | 1005 |     |     |     |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |
| cag tac cag gag ctc cct cga tgc                 | cc   | cc   | cc  | cc  | cc  | cc   | cc   | 3249 |     |     |     |     |     |     |     |
| Gln Tyr Gln Glu Leu Pro Arg Cys Pro Ala Pro     | Thr  | Pro  | Leu | Pro | Arg | Cys  | Pro  | Ala  | Pro | Thr | Pro | Ser | Leu |     |     |
| 1010  | 1015 | 1020 |     |     |     |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |
| ctc aac atc ccc ctc tcc agc ccg                 | gg   | gg   | cc  | cc  | cc  | cc   | gg   | 3294 |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu Asn Ile Pro Leu Ser Ser Pro Gly Arg Arg     | Arg  | Pro  | Leu | Ser | Ser | Pro  | Gly  | Arg  | Arg | Pro | Arg | Gly | Asp |     |     |
| 1025  | 1030 | 1035 |     |     |     |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |
| gtg gag agc agg ctg gat gcc ctc                 | ca   | cg   | ca  | ct  | aa  | ag   | ct   | 3339 |     |     |     |     |     |     |     |
| Val Glu Ser Arg Leu Asp Ala Leu Gln Arg Gln     | Leu  | Asn  | Arg | Leu | Asp | Ala  | Leu  | Gln  | Arg | Gln | Leu | Asn | Arg | Leu |     |
| 1040  | 1045 | 1050 |     |     |     |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |

|                    |                     |                     |            |            |             |      |
|--------------------|---------------------|---------------------|------------|------------|-------------|------|
| gag acc cgg        | ctg agt gca gac atg | gcc act gtc ctg cag | ctg cta    | 3384       |             |      |
| Glu Thr Arg        | Leu Ser Ala Asp Met | Ala Thr Val Leu Gln | Leu Leu    |            |             |      |
| 1055               | 1060.               | 1065                |            |            |             |      |
| cag agg cag        | atg acg ctg gtc ccg | ccc gcc tac agt gct | gtg acc    | 3429       |             |      |
| Gln Arg Gln        | Met Thr Leu Val Pro | Pro Ala Tyr Ser Ala | Val Thr    |            |             |      |
| 1070               | 1075                | 1080                |            |            |             |      |
| acc ccg ggg        | cct ggc ccc act tcc | aca tcc ccg ctg ttg | ccc gtc    | 3474       |             |      |
| Thr Pro Gly        | Pro Gly Pro Thr Ser | Thr Ser Pro Leu Leu | Pro Val    |            |             |      |
| 1085               | 1090                | 1095                |            |            |             |      |
| agc ccc ctc        | ccc acc ctc acc ttg | gac tcg ctt tct cag | gtt tcc    | 3519       |             |      |
| Ser Pro Leu        | Pro Thr Leu Thr Leu | Asp Ser Leu Ser Gln | Val Ser    |            |             |      |
| 1100               | 1105                | 1110                |            |            |             |      |
| cag ttc atg        | gcg tgt gag gag ctg | ccc ccg ggg gcc cca | gag ctt    | 3564       |             |      |
| Gln Phe Met        | Ala Cys Glu Glu Leu | Pro Pro Gly Ala Pro | Glu Leu    |            |             |      |
| 1115               | 1120                | 1125                |            |            |             |      |
| ccc caa gaa        | ggc ccc aca cga cgc | ctc tcc cta ccg ggc | cag ctg    | 3609       |             |      |
| Pro Gln Glu        | Gly Pro Thr Arg Arg | Leu Ser Leu Pro Gly | Gln Leu    |            |             |      |
| 1130               | 1135                | 1140                |            |            |             |      |
| ggg gcc ctc        | acc tcc cag ccc ctg | cac aga cac ggc tcg | gac ccg    | 3654       |             |      |
| Gly Ala Leu        | Thr Ser Gln Pro Leu | His Arg His Gly Ser | Asp Pro    |            |             |      |
| 1145               | 1150                | 1155                |            |            |             |      |
| ggc agt tagtggggct | gcccagtgtg          | gacacgtggc          | tcacccagg  | 3710       |             |      |
| Gly Ser            |                     |                     |            |            |             |      |
| tgctggggcg         | ctccccttgg          | aggccctgct          | caggaggccc | tgaccgtgga | aggggagagg  | 3770 |
| aactcgaaag         | cacagctcct          | cccccagccc          | ttgggaccat | cttctcctgc | agtccccctgg | 3830 |
| gccccagtga         | gaggggcagg          | ggcagggccc          | gcagtaggtg | gggcctgtgg | tccccccact  | 3890 |

gccctgaggg cattagctgg tctaactgcc cgaggcacc cggccctggg ccttaggcac 3950

ctcaaggact ttctgttat ttactgctt tattgttaag gataataatt aaggatcata 4010

tgaataatta atgaagatgc tgatgactat gaataataaa taattatcct gaggagaaaa 4070

<210> 2

<211> 1159

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 2

Met Pro Val Arg Arg Gly His Val Ala Pro Gln Asn Thr Phe Leu Asp  
1 5 10 15

Thr Ile Ile Arg Lys Phe Glu Gly Gln Ser Arg Lys Phe Ile Ile Ala  
20 25 30

Asn Ala Arg Val Glu Asn Cys Ala Val Ile Tyr Cys Asn Asp Gly Phe  
35 40 45

Cys Glu Leu Cys Gly Tyr Ser Arg Ala Glu Val Met Gln Arg Pro Cys  
50 55 60

Thr Cys Asp Phe Leu His Gly Pro Arg Thr Gln Arg Arg Ala Ala Ala  
65 70 75 80

Gln Ile Ala Gln Ala Leu Leu Gly Ala Glu Glu Arg Lys Val Glu Ile  
85 90 95

Ala Phe Tyr Arg Lys Asp Gly Ser Cys Phe Leu Cys Leu Val Asp Val  
100 105 110

Val Pro Val Lys Asn Glu Asp Gly Ala Val Ile Met Phe Ile Leu Asn  
115 120 125

Phe Glu Val Val Met Glu Lys Asp Met Val Gly Ser Pro Ala His Asp  
130 135 140

Thr Asn His Arg Gly Pro Pro Thr Ser Trp Leu Ala Pro Gly Arg Ala  
145 150 155 160

Lys Thr Phe Arg Leu Lys Leu Pro Ala Leu Leu Ala Leu Thr Ala Arg  
165 170 175

Glu Ser Ser Val Arg Ser Gly Gly Ala Gly Gly Ala Pro Gly  
180 185 190

Ala Val Val Val Asp Val Asp Leu Thr Pro Ala Ala Pro Ser Ser Glu  
195 200 205

Ser Leu Ala Leu Asp Glu Val Thr Ala Met Asp Asn His Val Ala Gly  
210 215 220

Leu Gly Pro Ala Glu Glu Arg Arg Ala Leu Val Gly Pro Gly Ser Pro  
225 230 235 240

Pro Arg Ser Ala Pro Gly Gln Leu Pro Ser Pro Arg Ala His Ser Leu  
245 250 255

Asn Pro Asp Ala Ser Gly Ser Ser Cys Ser Leu Ala Arg Thr Arg Ser  
260 265 270

Arg Glu Ser Cys Ala Ser Val Arg Arg Ala Ser Ser Ala Asp Asp Ile  
275 280 285

Glu Ala Met Arg Ala Gly Val Leu Pro Pro Pro Pro Arg His Ala Ser  
290 295 300

Thr Gly Ala Met His Pro Leu Arg Ser Gly Leu Leu Asn Ser Thr Ser  
305 310 315 320

Asp Ser Asp Leu Val Arg Tyr Arg Thr Ile Ser Lys Ile Pro Gln Ile  
325 330 335

Thr Leu Asn Phe Val Asp Leu Lys Gly Asp Pro Phe Leu Ala Ser Pro  
340 345 350

Thr Ser Asp Arg Glu Ile Ile Ala Pro Lys Ile Lys Glu Arg Thr His  
355 360 365

Asn Val Thr Glu Lys Val Thr Gln Val Leu Ser Leu Gly Ala Asp Val  
370 375 380

Leu Pro Glu Tyr Lys Leu Gln Ala Pro Arg Ile His Arg Trp Thr Ile  
385 390 395 400

Leu His Tyr Ser Pro Phe Lys Ala Val Trp Asp Trp Leu Ile Leu Leu  
405 410 415

Leu Val Ile Tyr Thr Ala Val Phe Thr Pro Tyr Ser Ala Ala Phe Leu  
420 425 430

Leu Lys Glu Thr Glu Glu Gly Pro Pro Ala Thr Glu Cys Gly Tyr Ala  
435 440 445

Cys Gln Pro Leu Ala Val Val Asp Leu Ile Val Asp Ile Met Phe Ile  
450 455 460

Val Asp Ile Leu Ile Asn Phe Arg Thr Thr Tyr Val Asn Ala Asn Glu  
465 470 475 480

Glu Val Val Ser His Pro Gly Arg Ile Ala Val His Tyr Phe Lys Gly  
485 490 495

Trp Phe Leu Ile Asp Met Val Ala Ala Ile Pro Phe Asp Leu Leu Ile  
500 505 510

Phe Gly Ser Gly Ser Glu Glu Leu Ile Gly Leu Leu Lys Thr Ala Arg  
515 520 525

Leu Leu Arg Leu Val Arg Val Ala Arg Lys Leu Asp Arg Tyr Ser Glu

530                535                540

Tyr Gly Ala Ala Val Leu Phe Leu Leu Met Cys Thr Phe Ala Leu Ile  
545                550                555                560

Ala His Trp Leu Ala Cys Ile Trp Tyr Ala Ile Gly Asn Met Glu Gln  
565                570                575

Pro His Met Asp Ser Arg Ile Gly Trp Leu His Asn Leu Gly Asp Gln  
580                585                590

Ile Gly Lys Pro Tyr Asn Ser Ser Gly Leu Gly Gly Pro Ser Ile Lys  
595                600                605

Asp Lys Tyr Val Thr Ala Leu Tyr Phe Thr Phe Ser Ser Leu Thr Ser  
610                615                620

Val Gly Phe Gly Asn Val Ser Pro Asn Thr Asn Ser Glu Lys Ile Phe  
625                630                635                640

Ser Ile Cys Val Met Leu Ile Gly Ser Leu Met Tyr Ala Ser Ile Phe  
645                650                655

Gly Asn Val Ser Ala Ile Ile Gln Arg Leu Tyr Ser Gly Thr Ala Arg  
660                665                670

Tyr His Thr Gln Met Leu Arg Val Arg Glu Phe Ile Arg Phe His Gln  
675                680                685

Ile Pro Asn Pro Leu Arg Gln Arg Leu Glu Glu Tyr Phe Gln His Ala  
690 695 700

Trp Ser Tyr Thr Asn Gly Ile Asp Met Asn Ala Val Leu Lys Gly Phe  
705 710 715 720

Pro Glu Cys Leu Gln Ala Asp Ile Cys Leu His Leu Asn Arg Ser Leu  
725 730 735

Leu Gln His Cys Lys Pro Phe Arg Gly Ala Thr Lys Gly Cys Leu Arg  
740 745 750

Ala Leu Ala Met Lys Phe Lys Thr Thr His Ala Pro Pro Gly Asp Thr  
755 760 765

Leu Val His Ala Gly Asp Leu Leu Thr Ala Leu Tyr Phe Ile Ser Arg  
770 775 780

Gly Ser Ile Glu Ile Leu Arg Gly Asp Val Val Val Ala Ile Leu Gly  
785 790 795 800

Lys Asn Asp Ile Phe Gly Glu Pro Leu Asn Leu Tyr Ala Arg Pro Gly  
805 810 815

Lys Ser Asn Gly Asp Val Arg Ala Leu Thr Tyr Cys Asp Leu His Lys  
820 825 830

Ile His Arg Asp Asp Leu Leu Glu Val Leu Asp Met Tyr Pro Glu Phe  
835 840 845

Ser Asp His Phe Trp Ser Ser Leu Glu Ile Thr Phe Asn Leu Arg Asp  
850 855 860

Thr Asn Met Ile Pro Gly Ser Pro Gly Ser Thr Glu Leu Glu Gly Gly  
865 870 875 880

Phe Ser Arg Gln Arg Lys Arg Lys Leu Ser Phe Arg Arg Arg Thr Asp  
885 890 895

Lys Asp Thr Glu Gln Pro Gly Glu Val Ser Ala Leu Gly Pro Gly Arg  
900 905 910

Ala Gly Ala Gly Pro Ser Ser Arg Gly Arg Pro Gly Gly Pro Trp Gly  
915 920 925

Glu Ser Pro Ser Ser Gly Pro Ser Ser Pro Glu Ser Ser Glu Asp Glu  
930 935 940

Gly Pro Gly Arg Ser Ser Ser Pro Leu Arg Leu Val Pro Phe Ser Ser  
945 950 955 960

Pro Arg Pro Pro Gly Glu Pro Pro Gly Gly Glu Pro Leu Met Glu Asp  
965 970 975

Cys Glu Lys Ser Ser Asp Thr Cys Asn Pro Leu Ser Gly Ala Phe Ser  
980 985 990

Gly Val Ser Asn Ile Phe Ser Phe Trp Gly Asp Ser Arg Gly Arg Gln  
995 1000 1005

Tyr Gln Glu Leu Pro Arg Cys Pro Ala Pro Thr Pro Ser Leu Leu  
1010 1015 1020

Asn Ile Pro Leu Ser Ser Pro Gly Arg Arg Pro Arg Gly Asp Val  
1025 1030 1035

Glu Ser Arg Leu Asp Ala Leu Gln Arg Gln Leu Asn Arg Leu Glu  
1040 1045 1050

Thr Arg Leu Ser Ala Asp Met Ala Thr Val Leu Gln Leu Leu Gln  
1055 1060 1065

Arg Gln Met Thr Leu Val Pro Pro Ala Tyr Ser Ala Val Thr Thr  
1070 1075 1080

Pro Gly Pro Gly Pro Thr Ser Thr Ser Pro Leu Leu Pro Val Ser  
1085 1090 1095

Pro Leu Pro Thr Leu Thr Leu Asp Ser Leu Ser Gln Val Ser Gln  
1100 1105 1110

Phe Met Ala Cys Glu Glu Leu Pro Pro Gly Ala Pro Glu Leu Pro

1115

1120

1125

Gln Glu Gly Pro Thr Arg Arg Leu Ser Leu Pro Gly Gln Leu Gly

1130

1135

1140

Ala Leu Thr Ser Gln Pro Leu His Arg His Gly Ser Asp Pro Gly

1145

1150

1155

Ser

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 3

aattggtaacc atgggctcag gatgccggtg c

31

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 4

gcttgtactc aggcagcacg t

21

<210> 5  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 5  
ccaccaggta ccgtgagatc a

21

<210> 6  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 6  
ttgcagtgt gcagcagtga g

21

<210> 7  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 7  
atgcttagcat cttcggaac g

21

<210> 8  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 8  
aattaagctt tttcgagttc ctctccctt c

31

<210> 9  
<211> 52  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> oligo DNA

<400> 9  
gatccccccgg gctgcaggaa ttgcataatcg ttaacgtcga cctcgagggt ac

52

<210> 10  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> oligo DNA

<400> 10  
cctcgagggtc gacgttaacg atatcgatt cctgcagccc gggg

44

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 11

gtcgtcatcg atacaaatgg cagtattcat cc

32

<210> 12

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 12

gtcgtcaagc ttcccaaactg gatctctgct gtcc

34

<210> 13

<211> 5020

<212> DNA

<213> Retroviral provirus

<400> 13

ctgcaggcctg aatatgggcc aaacaggata tctgtggtaa gcagttcctg cccggccta

60

gggccaagaa cagatggaac agctgaatat gggccaaaca ggatatctgt ggtaaggcagt

120

tcctgccccg gctcagggcc aagaacagat ggtccccaga tgcggtccag ccctcagcag

180

tttctagaga accatcagat gtttccaggg tgccccagg acctgaaaatg accctgtgcc

240

ttatttgaac taaccaatca gttcgcttct cgcttctgtt cgcgcgcttc tgctccccga 300  
gctcaataaaa agagcccaca accccctcact cggggcgcca gtcctccgat tgactgagtc 360  
gccccgggtac ccgtgtatcc aataaacccct ctigcagttg catccgactt gtggtctcgc 420  
tgttccttgg gagggctcgtcc tctgagtgat tgactacccg tcagcggggg tctttcattt 480  
gggggctcgt ccgggatcgg gagaccctg cccagggacc accgaccac caccggagg 540  
taagctggcc agcaacttat ctgtgtctgt ccgattgtct agtgtctatg actgattttt 600  
tgccgcctgcg tcggtaact agctctgtat ctggcggacc cgtggtgaa 660  
ctgacgagtt ctgaacaccc ggccgcaacc ctgggagacg tcccaggac tttggggcc 720  
gtttttgtgg cccgacctga ggaagggagt cgatgtggaa tccgaccccg tcaggatatg 780  
tggttctggt aggagacgag aacctaaaac agttccgccc tccgtctgaa ttttgcttt 840  
cggtttggaa ccgaagccgc gcgtcttgc tgctgcagca tcgttctgt ttgtctctgt 900  
ctgactgtgt ttctgttattt gtctgaaaat tagggccaga ctgttaccac tcccttaagt 960  
ttgaccttag atcactggaa agatgtcgag cggctcgctc acaaccagtc ggtagatgtc 1020  
aagaagagac gttgggttac cttctgctct gcagaatggc caaccttaa cgtcggatgg 1080  
ccgcgagacg gcaccttaa ccgagacctc atcacccagg ttaagatcaa ggtctttca 1140  
cctggccgc atggacaccc agaccaggc ccctacatcg tgacctggga agccttggct 1200  
tttgacccccc ctccctgggt caagccctt gtacacccta agcctccgcc tcctttctt 1260  
ccatccgcgc cgtctctccc ccttgaacct cctcttcga ccccgccctca atcctccctt 1320

tatccagccc tcactccttc tctaggcgcc ggccggatcc cagtgtggtg gtacgttagga 1380  
attcgccagc acagtggtcg acctgtggaa tgtgtgtcag ttagggtgtg gaaagtcccc 1440  
aggctccccca gcagggcagaa gtatgcaaag catgcacatctc aattagtcag caaccaggta 1500  
tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcac tcaattagtc 1560  
agcaaccata gtcccgcccc taactccgcc catcccgccc ctaactccgc ccagttccgc 1620  
ccattctccg ccccatggct gactaatttt ttttatttat gcagaggccg aggccgcctc 1680  
ggcctctgag ctattccaga agtagtgagg aggcttttt ggaggcctag gctttgcaa 1740  
acgctgcttg aggctgaagg tgcgttgctg gcgttttcc ataggctccg ccccccgtac 1800  
gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcaag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga 1860  
taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgtctc ctgttccgac cctgcccctt 1920  
accggataacc tgccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc 1980  
tgttaggtatc tcagttcggt gtaggtcggt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc 2040  
cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtgttgcgtc caaccggta 2100  
agacacgact tatgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggat 2160  
gtaggcgggt ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca 2220  
gtatttggta tctgcgtct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctc 2280  
tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt 2340  
acgatcgata aaataaaaga ttttatttag tctccagaaa aaggggggaa tgaaagaccc 2400  
cacctgttagg tttggcaagc tagcttaagt aacgccattt tgcaaggcat ggaaaaatac 2460

ataactgaga atagagaagt tcagatcaag gtcaggaaca gatggaacag ctgaatatgg 2520  
gccaaacagg atatctgtgg taagcagttc ctgccccggc tcagggccaa gaacagatgg 2580  
aacagctgaa tatggccaa acaggatatc tgtggtaagc agttcctgcc ccggctcagg 2640  
gccagaaca gatggtcccc agatgcggtc cagccctcag cagttcttag agaaccatca 2700  
gatgttcca gggtgccca aggacctgaa atgaccctgt gccttatttg aactaaccaa 2760  
tcagttcgct tctcgcttct gttcgcgcbc ttctgctccc cgagctcaat aaaagagccc 2820  
acaacccctc actcggggcg ccagtctcc gattgactga gtcggccggg taccctgtta 2880  
tccaataaac cctcttgcag ttgcattccga ctgtggctc cgctgttcc tgggagggtc 2940  
tcctctgagt gattgactac ccgtcagcgg gggtcttca catgcagcat gtatcaaaaat 3000  
taatttggtt tttttctta agtatttaca ttaaatggcc atagttgcat taatgaatcg 3060  
gccaacgcgc ggggagaggc gggttgcgtt ttggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg 3120  
actcgctgcg ctgggtcggtt cggctgcggc gagcgggtatc agctcactca aaggcggtaa 3180  
tacggttatc cacagaatca ggggataacg cagggaaagaa catgtgagca aaaggccagc 3240  
aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggtt ttccatagg ctccgcccc 3300  
ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat 3360  
aaagatacca ggcgtttccc cctggaaagct ccctcggtcg ctctcctgtt ccgaccctgc 3420  
cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc ctgcggaaag cgtggcgctt tctcatagct 3480  
cacgctgttagt gtatctcagt tcggtgttagg tcgttcgctc caagctggc tgtgtgcacg 3540

aaccccccgt tcagccccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgctt gagtccaacc 3600  
cggttaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga 3660  
ggtatgttagg cggtgctaca gagttcttga agtggtgcc taactacggc tacactagaa 3720  
ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta 3780  
gctcttgcac cggcaaacaa accaccgctg gttagcggtgg ttttttgg tgcaaggcagc 3840  
agattacgctc cagaaaaaaaaa ggatctcaag aagatcctt gatctttct acggggctcg 3900  
acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga 3960  
tcttcaccta gatccttta aattaaaaat gaagtttgcg gccgcaaatac aatctaaagt 4020  
atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca 4080  
gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgt aataactacg 4140  
atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca 4200  
ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtgg 4260  
cctgcaacct tatccgcctc catccagtttctt attaatttttgcggaaagc tagagtaagt 4320  
agttcgccag ttaatagttt ggcacacgtt gttgccatttgc acaggcat cgtgggtgtca 4380  
cgctcgtcgt ttggtatggc ttcatcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca 4440  
tgatccccca tgggttgcaaa aaaagcggtt agctccttcg gtccctccgat cgttgtcaga 4500  
agtaagttgg ccgcagtggtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact 4560  
gtcatgccat ccgtaaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga 4620  
gaatagtgtt tgcggcgacc gagttgtct tgcccggtt caacacggaa taataccgctc 4680

ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttttcggg gcgaaaactc 4740  
tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcggtgc acccaactga 4800  
tcttcagcat cttttacittt caccagcggtt tctgggttag caaaaacagg aaggcaaaat 4860  
gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttcaa tactcataact cttcctttt 4920  
caatattattt gaagcattta tcagggttat tgtctcatgt gcggatacat atttgaatgt 4980  
attttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc 5020

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017441

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00, C12N5/00, C12Q1/02, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00, C12N5/00, C12Q1/02, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.                                  |
|-----------|--|--|
| X<br>Y    | Nuss, H.B. et al., "Overexpression of a human potassium channel suppresses cardiac hyper-excitability in rabbit ventricular myocytes", J.Clin.Invest. (March, 1999), Vol.103, No.6, pages 889 to 896, particularly, Figs. 2 to 5   | 1,2,4-6,8,<br><u>11,12,14</u><br>3,7,9,10,13,<br>15-19 |
| X<br>Y    | Hoppe, U.C. et al., "Distinct gene-specific mechanisms of arrhythmia revealed by cardiac gene transfer of two long QT disease genes, HERG and KCNE1", Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 24 April, 2001 (24.04.01), Vol.98, No.9, pages 5335 to 5340, Abstract; page 5336, left column; Par. No. [0003]; Fig. 1 | 1,2,4-6,8,<br><u>11,12,14</u><br>3,7,9,10,13,<br>15-19 |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

|  |  |
|--|--|
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |
|--|--|

Date of the actual completion of the international search  
22 February, 2005 (22.02.05)Date of mailing of the international search report  
08 March, 2005 (08.03.05)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017441

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |  |
|---|---|--|
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.                                    |
| X   | Pfohl, J.L. et al., "Titratable expression of ion channels in mammalian cells utilizing baculovirus transduction", Society for Neuroscience Abstracts, (2001), Vol.27, No.2, page 2149(abstract) Database BIOSIS[online]; The Thomson Corp., [retrieved on 8 February, 2005] Accession No.2002:2827         | 1, 2, 4-6, 8,<br>11, 12, 14<br>3, 7, 9, 10, 13,<br>15-19 |
| Y   | WO 02/019966 A2 (Johns Hopkins University), 14 March, 2002 (14.03.02), Example 5; Fig.5AB; page 17, Par. Nos. [0003] to [0004]; Claims 45, 46<br>& CA 2421584 A & AU 2001088807 A<br>& US 2002/155101 A1 & EP 1324780 A2<br>& JP 2004-533405 A & NO 2003001015 A<br>& US 2004/266716 A1 & US 2004/266717 A1 | 1, 2, 4-6, 8,<br>11, 12, 14<br>3, 7, 9, 10, 13,<br>15-19 |
| Y   | WO 03/027634 A2 (Brown, S.J.), 03 April, 2003 (03.04.03), Claims<br>& US 2003/082511 A1 & AU 2002336768 A1  | 1-19   |

DESI AVAILABLE COPY

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl' C12N15/00, C12N5/00, C12Q1/02, C12Q1/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl' C12N15/00, C12N5/00, C12Q1/02, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号                   |
|-----------------|---|------------------------------------|
| X               | Nuss, H. B. et al., "Overexpression of a human potassium channel suppresses cardiac hyperexcitability in rabbit ventricular myocytes" J. Clin. Invest. (March, 1999), Vol. 103, No. 6, pp. 889-896, 特にFig. 2-5参照  | 1, 2, 4-6, 8,<br><u>11, 12, 14</u> |
| Y               |   | 3, 7, 9, 10, 13,<br>15-19          |
| X               | Hoppe, U. C. et al., "Distinct gene-specific mechanisms of arrhythmia revealed by cardiac gene transfer of two long QT disease genes, HERG and KCNE1" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2001 Apr 24), Vol. 98, No. 9, pp. 5335-5340, 要約, p. 5336左欄第3段及びFig. 1落参照 | 1, 2, 4-6, 8,<br><u>11, 12, 14</u> |
| Y               |   | 3, 7, 9, 10, 13,<br>15-19          |

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 02. 2005

国際調査報告の発送日

08. 3. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

新留 豊

4B 9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C(続き) .         | 関連すると認められる文献   |                                    |
|-----------------|--|------------------------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号                   |
| X               | Pfohl, J. L. et al., "Titratable expression of ion channels in mammalian cells utilizing baculovirus transduction"   | 1, 2, 4-6, 8,<br><u>11, 12, 14</u> |
| Y               | Society for Neuroscience Abstracts, (2001), Vol. 27, No. 2, pp. 2149 (abstract) Database BIOSIS [online]; The Thomson Corp., [retrieved on 8 Feb. 2005] Accession no., 2002:2827 | 3, 7, 9, 10, 13,<br>15-19          |
| X               | WO 02/019966 A2 (Johns Hopkins University), 2002.03.14<br>実施例5, Fig. 5AB, p. 17第3-4段落, 請求の範囲45, 46参照   | 1, 2, 4-6, 8,<br><u>11, 12, 14</u> |
| Y               | & CA 2421584 A & AU 2001088807 A & US 2002/155101 A1<br>& EP 1324780 A2 & JP 2004-533405 A & NO 2003001015 A<br>& US 2004/266716 A1 & US 2004/266717 A1                          | 3, 7, 9, 10, 13,<br>15-19          |
| Y               | WO 03/027634 A2 (Brown, S. J.), 2003.04.03<br>請求の範囲参照<br>& US 2003/082511 A1 & AU 2002336768 A1  | 1-19                               |